

ZEITSCHRIFT FÜR VERERBUNGSLEHRE

HERAUSGEGEBEN UND GELEITET

VON

**CH. AUERBACH · H. BAUER · E. HADORN · A. KÜHN
G. MELCHERS · F. OEHLKERS · F. RYAN · H. STUBBE**

89. BAND

MIT 285 TEXTABBILDUNGEN, DAVON 1 FARBIGE



**SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958**

Alle Rechte vorbehalten
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in
dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der
Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-
Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt
werden dürften

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg

Inhalt des 89. Bandes

1. Heft

(Abgeschlossen am 13. Februar 1958)

	Seite
OSTER, I. I., Interactions between ionizing radiation and chemical Mutagens	1
CUANY, R. L., A. H. SPARROW and V. POND, Genetic response of <i>Antirrhinum majus</i> to acute and chronic plant irradiation. With 6 Figures in the Text	7
RENNER, O., Über den Erbgang des cruciata-Merkmals der Oenotheren. VI. Mitteilung. Verbindungen der Oenothera lamarckiana Mut. blandina. Mit 19 Textabbildungen	14
LINNERT, G., Kerngesteuerte Gynodiözie bei <i>Salvia nemorosa</i>	36
GOTTSCHALK, W., Untersuchungen zum Problem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen. Mit 20 Textabbildungen	52
DOWRICK, G. J., Abnormal gametogenesis and embryo abortion in the pear variety Beurré Bedford (<i>Pyrus communis</i>). With 7 Figures in the Text	80
BRINK, R. A., and B. MIKULA, Plant color effects of certain anomalous forms of the <i>R^r</i> allele in maize	94
LINDSLEY, D. L., Spermatogonial exchange involving the X but not the Y chromosome in <i>Drosophila melanogaster</i> . With 6 Figures in the Text	103
CLARK, A. M., The mutagenic action of pyronin in <i>Drosophila</i>	123
BERGFELD, R., Mutationsauslösung durch Chemikalien bei <i>Antirrhinum majus</i> L.	131
BERGFELD, R., Untersuchungen an einigen Blattfarbenmutanten der Sippe 50 von <i>Antirrhinum majus</i> L. Mit 7 Textabbildungen	143

2. Heft

(Abgeschlossen am 25. April 1958)

ARNOLD, C.-G., Untersuchungen zur Pollenfertilität trisomer Oenotheren. Mit 1 Textabbildung	161
POHLENDT, G., Variabilität der Chromosomenzahlen und andere Kernpathologien in <i>Aegilops triuncialis</i> × <i>Triticum aestivum</i> -Bastarden. Mit 14 Textabbildungen	170
STUBBE, W., Dreifarbenpanaschierung bei <i>Oenothera</i> . II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. Mit 9 Textabbildungen	189
GOTTSCHALK, W., Über Abregulierungsvorgänge bei künstlich hergestellten hochpolyploiden Pflanzen. Mit 16 Textabbildungen.	204
NAKAO, Y., Y. TAZIMA and Y. SAKURAI, Specificity of interactions between the individual gene locus and the structure of chemical mutagens	216
HADORN, E., und I. ZIEGLER-GÜNDER, Untersuchungen zur Entwicklung, Geschlechtsspezifität und phänotypischen Autonomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von <i>Drosophila melanogaster</i> . Mit 9 Textabbildungen	221
ZIEGLER-GÜNDER, I., und E. HADORN, Manifestation rezessiver Augenfarb-Gene im Pterin-inventar heterozygoter Genotypen von <i>Drosophila melanogaster</i> . Mit 6 Textabbildungen	235
MÜLLER, I., Cytogenetische Untersuchungen an Translokationsheterozygoten von <i>Petunia hybrida</i> . Mit 11 Textabbildungen	246
TRAUTNER, TH. A., Untersuchungen an Heterozygoten des Phagen T 1. Mit 2 Textabbildungen	264
NEF, W., Die Variabilität der Manifestation der Mutante <i>Pearl</i> (<i>Pl</i>) von <i>Drosophila melanogaster</i> . Mit 17 Textabbildungen.	272

Kurze Mitteilung

STUBBE, W., und L. DIERS, Die Chromosomenformel des <i>albicans</i> -Komplexes der Sippe Grado von <i>Oenothera suaveolens</i>	320
--	-----

3. Heft

(Abgeschlossen am 1. Juli 1958)

	Seite
KLEIN, D. T., Randomness of nuclear Distribution in Conidia of <i>Neurospora</i> heterokaryons	323
BLACKITH, R. E., und M. I. ROBERTS, Farbenpolymorphismus bei einigen Feldheuschrecken. Mit 5 Textabbildungen	328
SYBENGA, J., Inbreeding effects in rye. With 3 Figures in the text	338
HILL, R. F., The mutation of <i>Escherichia coli</i> to resistance to bacteriophages T1 and T1s. With 6 Figures in the text	355
SPRINGER, R., Die Koppelungsverhältnisse bei den beiden Geschlechtern von <i>Megaselia scalaris</i> LOEW (= <i>Aphiochaeta xanthina</i> SPEIS). (<i>Phoridae</i>)	373
RENNER, O., Über den Erbgang des <i>cruciata</i> -Merkmals der Oenotheren. VIII. Mitteilung. Verbindungen der <i>Oenothera atrovirens</i> , und Rückblick. Mit 5 Textabbildungen	377
MALY, R., Eine genetisch bedingte Störung der Zelltrennung bei <i>Paramaecium aurelia</i> var. 4. Ein Beitrag zum Problem der Mutabilität plasmatischer Systeme. Mit 10 Textabbildungen	397
SPELICH, D., Modellversuche zur Selektionswirkung verschiedener chromosomaler Strukturtypen von <i>Drosophila subobscura</i> COLL. Mit 1 Textabbildung	422
KÖHLER, D., Zur Vererbung der Monözie beim Hanf. Mit 4 Textabbildungen	437
KARLIK, A., Vererbungsversuche mit <i>Drosophila ambigua</i> POM. Mit 6 Textabbildungen	448
BRESCH, C., und P. STARLINGER, Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. Die Hypothese der kompletten Kooperation. Mit 3 Textabbildungen	459

Kurze Mitteilungen

MALY, R., Die Genetik einiger strahleninduzierter, abweichender Plastidenformen bei Farnen	469
MOSIG, G., Gene für Blüten- und Pollenfärbung bei <i>Petunia</i>	471

4. Heft

(Abgeschlossen am 29. September 1958)

HARTE, C., Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei <i>Oenothera</i> unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. I. Mitteilung: Die individuelle Komponente der Variabilität	473
HARTE, C., Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei <i>Oenothera</i> unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. II. Mitteilung: Die Umweltkomponente der Variabilität	497
ZEUTZSCHEL, B., Entwicklung und Lage der Augenpigmente bei verschiedenen <i>Drosophila</i> -Mutanten. Mit 11 Textabbildungen	508
STUMM, C., Die Analyse von Genmutanten mit geänderten Fortpflanzungseigenschaften bei <i>Allomyces arbuscula</i> BUTL. Mit 13 Textabbildungen	521
RAPER, J. R., J. P. SAN ANTONIO and P. G. MILES, The expression of mutations in common- <i>A</i> heterokaryons of <i>Schizophyllum commune</i> . With 2 Figures in the Text	540
OEHLKERS, F., und U. EBELL, Bastardierungsversuche in der Gattung <i>Streptocarpus</i> Lindley. VII. Die genischen und plasmonischen Grundlagen für die Pollensterilität verschiedener <i>Streptocarpus</i> -Bastarde. Mit 5 Textabbildungen	559
HAGEMANN, R., Somatische Konversion bei <i>Lycopersicon esculentum</i> MILL. Mit 9 Textabbildungen	587
MUNDY, K. W. und A. GIERER, Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nucleinsäure <i>in vitro</i> . Mit 7 Textabbildungen	614

5. (Schluß)-Heft

(Abgeschlossen am 5. Dezember 1958)

LEVINE, R. P., and W. T. EBERSOLD, The relation of calcium and magnesium to crossing over in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	631
KUNZE-MÜHL, E., E. MÜLLER und D. SPELICH, Qualitative, quantitative und jahreszeitliche Untersuchungen über den chromosomalen Polymorphismus natürlicher Populationen von <i>Drosophila subobscura</i> COLL. in der Umgebung von Wien	636

KAPPUS, A., Untersuchungen über die Verbreitung des <i>sulfurea</i> -Merkmals in Populationen von Wildoenotheren	647
MÖHLMANN, E., Chromatographische Untersuchungen an verschiedenen Genotypen von <i>Plodia interpunctella</i> im Vergleich mit anderen Schmetterlingsarten. Mit 18 Textabbildungen	651
GOODMAN, F., A study of the mechanism of resistance to ultraviolet light in a strain of <i>Neurospora crassa</i> . With 5 Figures in the Text	675
MALY, R., Die Mutabilität der Plastiden von <i>Antirrhinum majus</i> L. <i>Sippe 50</i>	692
ENCKE, W., Die Abhängigkeit der Körperfarbe bei <i>Drosophila melanogaster</i> von einem genbedingten Hemmstoff. Mit 6 Textabbildungen	697
POHLEY, H.-J., und H. ESSER, Über das Verhalten muntanter Schuppen auf den Hinterflügeln der Mehlmotte <i>Ephestia kuehniella</i> nach Puppenbestrahlungen. Mit 1 Textabbildung	707
HARTE, C., Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei <i>Oenothera</i> unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. III. Mitteilung. Die genetische Komponente der Variabilität	715
ESSER, K., und J. STRAUB, Genetische Untersuchungen an <i>Sordaria macrospora</i> AUERSW., Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. Mit 6 Textabbildungen, davon 1 farbige	729
NÜRNBERG-KRÜGER, U., Genetische Untersuchungen an diploiden <i>Fragaria</i> -Arten. I. Mitteilung. Die Kreuzung zwischen <i>Fr. vesca</i> und <i>Fr. nilgerrensis</i> , ihre Auswirkung auf die Morphologie der Pflanzen und die Ausbildung des Geschlechts. Mit 9 Textabbildungen	747
Adresse des X. International Congress of Genetics zum fünfzigjährigen Bestehen der „Zeitschrift für Vererbungslehre“	774
Autorenverzeichnis	775

Department of Zoology*, Indiana University, Bloomington, Indiana

INTERACTIONS BETWEEN IONIZING RADIATION AND CHEMICAL MUTAGENS **

By

IRWIN I. OSTER

(Eingegangen am 4. September 1957)

PATERSON and THOMPSON (1949) had found that pre-treatment of fern spores and fern tissue cultures with ethyl carbamate (urethane) suppressed the inhibitory action of X-rays on mitosis and KARNOFSKY et al. (1947) found that X-irradiation of mice one hour prior to the injection of nitrogen mustard resulted in only a slightly higher mortality than when either agent was given alone while the reversed order of treatment resulted in a more nearly additive effect. On the other hand more recently KIRSCHBAUM and KAWAMOTO (1957) have reported that urethane potentiated X-ray leukemogenesis in mice and nullified the protective effect of thigh-shielding in mice irradiated with lethal doses of X-rays. Using *Drosophila melanogaster* AUERBACH (1949) obtained a strictly additive effect on sex-linked lethal mutations from an analysis of the offspring of males which had been subjected to X-rays following an exposure to mustard gas on the previous day. Since interphase is relatively less sensitive to mutagens than metaphase (SPARROW, 1951 and OSTER, 1954), KARNOFSKY's findings of a seeming antagonism between X-rays and the mustards may perhaps be explained by the fact that the suppression of mitosis engendered by the administration of radiation decreased the sensitivity of the mice to the subsequent injection of nitrogen mustard. He failed to get a similar effect when mustard was applied prior to X-irradiation although mustard also suppresses cell division. However, this may be due to a difference in the time which it takes for the mustard-induced inhibition to become manifested as compared to the one or two hours following treatment during which the X-ray induced inhibition occurs (CARLSON, 1954).

Aside from the above studies very little has been done in the way of systematic analyses of the effects of combination treatments with ionizing radiation and chemical mutagens. In an attempt to further investigate the possible interactions between physical and chemical mutagens, we carried out a series of experiments involving the treatment of male germ cells of *Drosophila melanogaster* with either ethyl carbamate (urethane) and X-rays or with sulfur mustard (mustard gas) and X-rays, the mutagenic efficiency of these agents when administered separately having been first demonstrated by MULLER (1927) for X-rays, by AUERBACH and ROBSON (1941) for the mustards (although the information could not be published in declassified form until 1946, AUERBACH and ROBSON, 1946, 1947 a, b), and by OELKERS (1943) for the carbamates.

* Contribution No. 629.

** This work was supported by a grant from the British Empire Cancer Campaign administered by Dr. CHARLOTTE AUERBACH.

Methods

Professor MULLER kindly provided us with his specially constructed "multi-purpose" stocks (1954) which allowed for the detection of losses of chromosomes and chromosome parts, sex-linked lethal mutations, and translocations in the offspring of the same treated individuals. This is particularly useful when one wishes to compare the frequencies of occurrence of these phenomena when caused by the same dose of a chemical mutagen because with chemical treatments duplication of dosage from experiment to experiment is fraught with difficulty and uncertainty. The "multi-purpose" males whose germ cells were to be analyzed genetically in subsequent generations for either spontaneous or induced hereditary variations contained the markers and inversions designated $sc^8 \cdot Y(y^+)/y \text{ In49 } B; bw^D$ (although these males had the recessive gene, *yellow* (y), in the X chromosome they looked non-yellow because the Y chromosome carried a small insertion of the left end of the X bearing the normal dominant allele of *yellow* (y^+); they also contained the markers *Bar eye* (B) and *brown-Dominant* (bw^D) and the females to which they were crossed were homozygous for the so-called "X · Y chromosome", that is, a sex chromosome having the short arm of the Y chromosome (Y^S) attached distally and the long arm of the Y (Y^L) attached proximally (LINDSLEY and NOVITSKI, 1950. et. seq.); their complete genotype was $X \cdot Y \text{ InEN } y; st$ (*scarlet*).

The expected F_1 flies resulting from the cross should fall into two classes, *yellow* (y) *Bar* (B) females and *non-yellow* males (y^+) ($sc^8 \cdot Y f[y^+]/y$). Loss of either the X or Y or part of the Y containing the normal allele of *yellow* (y^+) would yield *yellow* exceptional males which thus represent the frequency of chromosome loss. In order to test for lethal mutations the F_1 females were bred individually and the offspring were examined for the presence of *Bar* males; their absence indicated the presence of a lethal mutation. Individual F_1 males were mated to $y; st$ females and the absence of one or both classes of recombinants involving any of the three pairs of markers, (y vs. y^+ , bw^D vs. bw^+ , and st vs. st^+) considered two pairs at a time, then indicated the presence of a translocation between the chromosomes with those markers or their alleles. Matings which yielded insufficient flies for the determination of whether or not a lethal or translocation was present were retested by repeating with the F_2 flies crosses like those of the F_1 .

A number of alterations were carried out on the existing mustard gas apparatus as described by AUERBACH and MOSER (1951) in order to allow a control more adequate of the dosage of gas delivered within a definite period of time. Instead of suction, compressed air from a cylinder was used for directing a steady stream of mustard gas-saturated air through the chamber which contained the flies. The chamber itself had been considerably increased in length and was placed horizontally, in order that large numbers of flies could be exposed simultaneously to the same dose of gas. Wherever possible, rubber connections which tend to absorb mustard gas had been replaced by air-tight ground-glass joints, and the whole apparatus had been arranged so that it could be accommodated within a fume cupboard, the temperature of which was regulated; as an additional measure of temperature control, most of the apparatus, excluding the exposure chamber

and the drying chambers for the air, was immersed in a waterbath of regulated temperature.

Although we were able to obtain fairly repeatable quantitative results with our modified treatment chamber, all the flies which were to be X-rayed and/or exposed to mustard gas were treated simultaneously; the different groups were distinguished by different markings which had been made with "water-proof" ink on the thorax. By exposing the flies which were to have different combinations of X-rays and/or mustard gas at the same time to the treatment which they had in common, variations in dosage were minimized. Groups of 3-4-day-old adult males were treated with either X-rays alone (1500r; 70 kV, dose delivered at a rate of 180r/minute through a 0.5 mm thick aluminium filter), or mustard gas ($\beta\beta'$ -dichlorodiethylsulfide) alone (15 minute exposure), or X-rays followed within 1 hour by mustard gas, or mustard gas followed within 1 hour by X-rays.

For the studies involving urethane, 3-4-day-old adult males which had been starved for 8 hours were fed with standard *Drosophila* medium containing a 2.5 M concentration of urethane (ethyl carbamate). Previously we had found that this dose represents the LD₅₀ for ethyl carbamate administered orally to adult *Drosophila* males. After 10 days they were irradiated along with a group of flies which had not been fed urethane.

The treated males were mated individually to 3 females. After 3 days the males and females were separated, the former being discarded while all the inseminated females were allowed to oviposit for an additional 10 days in order to obtain a maximum yield of offspring. The F₁ flies were examined for yellow exceptional males, and their siblings were tested for lethals and translocations.

Results

Examination of the offspring of the treated flies yielded the following frequencies of heritable changes:

Table 1

	X-rays	Mustard gas	X-rays then mustard gas	Mustard gas then X-rays
Loss of the paternal X or Y chromosome	$\frac{19}{934} = 2.0\%$	$\frac{11}{847} = 1.3\%$	$\frac{37}{1216} = 3.0\%$	$\frac{26}{917} = 2.8\%$
Sex-linked lethal mutations	$\frac{21}{685} = 3.0\%$	$\frac{16}{485} = 3.2\%$	$\frac{25}{466} = 5.3\%$	$\frac{29}{481} = 6.0\%$
Translocations	$\frac{39}{613} = 6.3\%$	$\frac{6}{543} = 1.1\%$	$\frac{26}{216} = 12.0\%$	$\frac{60}{596} = 10.0\%$

A second experiment, in which the flies were similarly treated to those referred to above, but only examined for translocations, gave essentially similar results, the relative frequencies being as in Table 2.

Table 2

	X-rays	Mustard gas	X-rays then mustard gas	Mustard gas then X-rays
Translocations	$\frac{28}{413} = 6.7\%$	$\frac{6}{381} = 1.7\%$	$\frac{26}{216} = 12.0\%$	$\frac{52}{525} = 9.9\%$

The experiment involving urethane and X-rays yielded the results shown in Table 3.

Table 3

	X-rays	Urethane	Urethane and X-rays
Loss of the paternal X or Y chromosome	$\frac{23}{1529} = 1.5\%$	$\frac{27}{1167} = 2.3\%$	$\frac{31}{906} = 3.4\%$
Sex-linked lethal mutations	$\frac{8}{375} = 2.1\%$	$\frac{4}{215} = 1.8\%$	$\frac{12}{284} = 4.2\%$
Translocations	$\frac{37}{593} = 6.2\%$	$\frac{4}{320} = 1.2\%$	$\frac{37}{354} = 10.4\%$

Discussion

These two sets of experiments indicate that when X-radiation is combined with either mustard gas or urethane, the mutagenic effect on *Drosophila* spermatozoa is strictly additive. This suggests that the mutagenic processes initiated by these three agents are either alike or quite independent. Somewhat similar findings of non-synergistic action for X-rays and mustard gas had been made previously by AUERBACH for lethal mutations in *Drosophila* and by SWANSON (1952) for visible mutations in *Aspergillus*. On the other hand an examination of the translocation frequencies resulting from the combined treatments indicates that mustard gas and X-rays are synergistic as regards their disarrangement-producing action. This is not synergism in the sense that one treatment potentiates the other, but only in the sense that the products of one interact with those of the other. Since the type of disarrangement which has been detected in the above-mentioned experiments is the result of at least two breaks in two non-homologous chromosomes and their subsequent reunion to form a new arrangement (i.e., translocation) one can calculate the frequency of translocations which one would obtain if, instead of mustard gas or urethane, a dose of X-rays yielding an equivalent number of breaks had been given in addition to the first dose of X-rays. This reckoning can be made because the ends of chromosomes broken in mature spermatozoa do not undergo reunion until the time of fertilization. In the calculations it should be taken into consideration that the translocation-frequency varies as the $3/2$ power of the dose due to the formation of complex disarrangements at higher doses which lead to the death of the individuals carrying them and thus are not detected.

For example, using the values given in Table 2 we can make the following expected estimations:

1500r yields 6.7% (translocations)

x r yields 1.7% (translocations)

$$(1500r)^{3/2} : (x)^{3/2} = 6.7 : 1.7$$

Solving for x we obtain 600r (i.e., the dose of X-rays which would yield a 1.7% frequency of translocations).

$$(1500r + x)^{3/2} : (1500r)^{3/2} = y : 6.7\%$$

Substituting the value for x we obtain:

$$(2100r)^{3/2}:(1500r)^{3/2}=y:6.7\%$$

Solving for y we obtain 11.2% as the frequency of translocations which would be obtained if an equivalent dose of X-rays had been used instead of mustard gas. This expected value does not differ significantly from the values which we obtained for the combination treatments (i.e., 12.0%, 10.9%, 12.0%, 9.9%).

Although the calculations for the other 2 tables (i.e., 1 and 3) are not presented it can readily be seen, on the basis of their frequencies being so similar to the ones of Table 2 (which were used in the sample estimation given above), that the translocation frequencies obtained by combination treatments (i.e. X-rays and mustard gas or urethane) fulfill the same expectations. On the other hand, all of them deviate significantly from additivity.

These data indicate that the ends of chromosomes broken by mustard gas or urethane can unite freely with the ends of chromosomes broken by X-rays; while this does not necessarily argue for a similarity of initial reactions, it indicates that their final effects are the same. Also these findings, like those of NASRAT, KAPLAN, and AUERBACH (1954), lend further support to the view that the formation of disarrangements produced by X-rays, mustard gas, and urethane proceed via "breakage-first" (STADLER, 1932) of the chromosomes rather than "contact-first".

While our work supports previous results concerning the paucity of translocations following mustard gas treatment (NASRAT, KAPLAN, and AUERBACH 1954) it also indicates that urethane is a fairly potent mutagen, having produced lethal mutations and translocations in spermatozoa after having been introduced by such a relatively circuitous route as the one afforded by feeding (OSTER, 1954).

Aside from the theoretical implications of our results on combination treatments, they may also be of interest in cancer therapy. When X-rays and mustards or urethane are applied to the same tissue, the number of breaks and the cell deaths which result from simple breakage will be additive. But since two breaks in the same cell are required for the formation of a lethal disarrangement, their number will increase as nearly the square of the number of breaks, and thus there will be a synergistic component in the effects of combined treatment. This coupled with the fact that certain combination treatments may be less than additive in regard to their undesirable physiological side-effects would make them extremely useful as therapeutic tools in the battle against cancerous growths. Naturally the proper combinations of agents would have to be ascertained from clinical tests, but that such combinations are probable can be expected on general grounds on the basis of the diversity of pharmacological properties which mutagens are known to possess in addition to their common property of the ability affect genes and chromosomes.

Summary

1. X-rays in combination with urethane or mustard gas exhibit an additive effect as regards the formation of sex-linked recessive lethal mutations and chromosome breaks when applied to *Drosophila melanogaster* spermatozoa.
2. Their action in combination on the formation of translocations is synergistic.
3. The ends of chromosomes broken by X-rays, mustard gas, and urethane are as capable of rejoining with those produced by the same agent as the X-ray

produced-ones are of rejoining with those produced by either mustard gas or urethane to form chromosomal disarrangements.

Acknowledgment. I would like to express my sincere appreciation to Dr. C. AUERBACH for having suggested the problem, and for all the useful suggestions and encouragement which she gave me during the course of this work. I would also like to thank Professor C. H. WADDINGTON for having provided me with the facilities necessary for carrying out the work.

Literature cited

AUERBACH, C.: Chemical induction of mutations I. Discovery of the mutagenic action of mustard gas. Proc. Internat. Congr. Genet. 8th Congr., Stockholm, 1949. Hereditas (Lund) Suppl. **1949**, 128. — AUERBACH, C., and H. MOSER: The effect of oxygen concentration on the mutagenic action of mustard gas. Experientia (Basel) **7**, 341 (1951). — AUERBACH, C., and J. M. ROBSON: Chemical production of mutations. Nature (Lond.) **157**, 302 (1946). — The production of mutations by chemical substances. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect. B **62**, 271 (1947). — CARLSON, J. G.: Immediate effects on division, morphology, and viability of the cell. In: Radiation Biology, Part I, p. 763. A. Hollaender, edit. 1954. — KARNOFSKY, D. A., J. H. BURCHEVAL, R. A. ORMSBEC, I. CORNMAN and C. P. RHOADS: Experimental observations on the effects of the nitrogen mustards on neoplastic tissues. Cancer Res. **7**, 50 (1947). — KIRSCHBAUM, A., and S. KAWAMOTO: Potentiating effect of urethane on the induction of mouse leukemia by X-rays. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. **2**, 222 (1957). — LINDSLEY, D. L., and E. NOVITSKI: The synthesis of an attached XY chromosome. Dros. Inf. Serv. **24**, 84 (1950). — MULLER, H. J.: Artificial transmutation of the gene. Science (Lancaster, Pa.) **66**, 84 (1927). — Multipurpose stocks for studies of mutagenesis. Dros. Inf. Serv. **28**, 144 (1954). — NASRAT, G. E., W. D. KAPLAN and C. AUERBACH: A quantitative study of mustard gas induced chromosome breaks and rearrangements in *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **86**, 249 (1954). — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Vererbungslehre **81**, 313 (1943). — OSTER, I. I.: The effect of mitotic poisons on the sensitivity of *Drosophila* germ cells to ionizing radiation. Congr. No. (8th Internat. Congr. for Cell Biology.) Excerpta med. **8**, 406 (1954). — The induction of mutations in *Drosophila melanogaster* by orally administered ethyl carbamate (urethane). Rec. Genet. Soc. **24** and Genetics **40**, 588 (1955). — PATERSON, E., and M. V. THOMPSON: Effect of urethane combined with X rays on chick fibroblasts. Nature (Lond.) **163**, 563 (1949). — SPARROW, A. H.: Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. Ann. New York Acad. Sci. **51**, 1508 (1951). — STADLER, L. J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 6th Internat. Congr. Genet. **1**, 274 (1932). — SWANSON, C. P.: The effect of supplementary factors on the radiation-induced frequency of mutations in *Aspergillus terreus*. J. Cellular Comp. Physiol. Suppl. **1**, 39, 27 (1952).

Dr. IRWIN I. OSTER, Department of Zoology, Indiana University, Bloomington (Indiana)

Department of Biology, Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y.

GENETIC RESPONSE OF *ANTIRRHINUM MAJUS* TO ACUTE AND CHRONIC PLANT IRRADIATION*

By

ROBIN L. CUANY, ARNOLD H. SPARROW and VIRGINIA POND

With 6 Figures in the Text

(Eingegangen am 14. August 1957)

Somatic mutation rate in plants under both acute and chronic irradiation has been studied in two clonal lines (S-13 and S-21) of *Antirrhinum majus* (snapdragon) heterozygous for three flower color genes. Acute treatments were made with 250 KVP, 30 ma. X rays (1 mm Al filter) at a dose rate of 340 r per minute, and chronic exposures with gamma radiation from cobalt-60 at dose rates varying from 0.4 to 285 r/day in the gamma radiation field, as described by SPARROW and SINGLETON (1953).

The three color genes involved are *white*, *dilute* and *lavender*, as interpreted by HANEY (unpubl.) to correspond respectively to the genes *nivea*, *eos.*, and *pal.* of STUBBE (1941). Spontaneous and induced color changes have been observed on the petals of snapdragons in the form of flecks or streaks and are interpreted as mutational events (see *Discussion*). Changes from purple to white or pink are considered to be mutations at the *white*, and *dilute* or *lavender* loci respectively. It is technically difficult to distinguish a pink from a lavender spot, and flecks of less than eight cells all look pink. The results discussed in this paper are therefore based on the total number of mutations, i. e., mutation rate cannot be specified for each locus. The number of cells in a spot or sector showing the color change ranges from one to several million depending upon the time in flower development when the mutation occurred. The standard scoring procedure was to count the number of mutant spots (of eight or more cells) per 3 sq. cm. area from each flower scored (see SPARROW and POND, 1956, for additional details).

1. Acute X-radiation experiments

Plants in pre-flowering stages were irradiated with 1,000 r of X rays in a pilot experiment and grown in a greenhouse at a temperature of 15—18° C. The time schedule of inflorescence development was not changed significantly by the irradiation. The flowers which opened on these plants up to the 15th day showed no effect, but on the 16th to 19th days newly opened flowers showed a dense mottling of one- and two-cell mutant spots. Flowers opening on successive days had smaller numbers of larger-sized mutations (Fig. 1). The maximum number of discrete countable spots occurred on about the 21st day when most of the spots contained eight cells. In order to make most use of the data from spots of larger size or mixed sizes, the number of spots of known size was converted to its equivalent in terms of single-cell mutations per 200,000 cells, assuming that all cells

* Research carried out at the Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U.S. Atomic Energy Commission.

divided at the same rate. For example, on one flower there were 366 eight-cell spots in 3 sq. cm. of petal epidermis, which includes approximately 200,000 cells. If all cells had divided 3 times, there must have been 366 single-cell mutations in 25,000 cells, and this is equivalent to 2,928 single-cell mutations per 200,000 original cells.

It need not be inferred that chromosomes of the petal epidermis are mutated as units at the time of irradiation, or that such cells undergo only 3 divisions in the last 21 days before flowering (at 15–18° C). Since chromosomes (or chromatids)

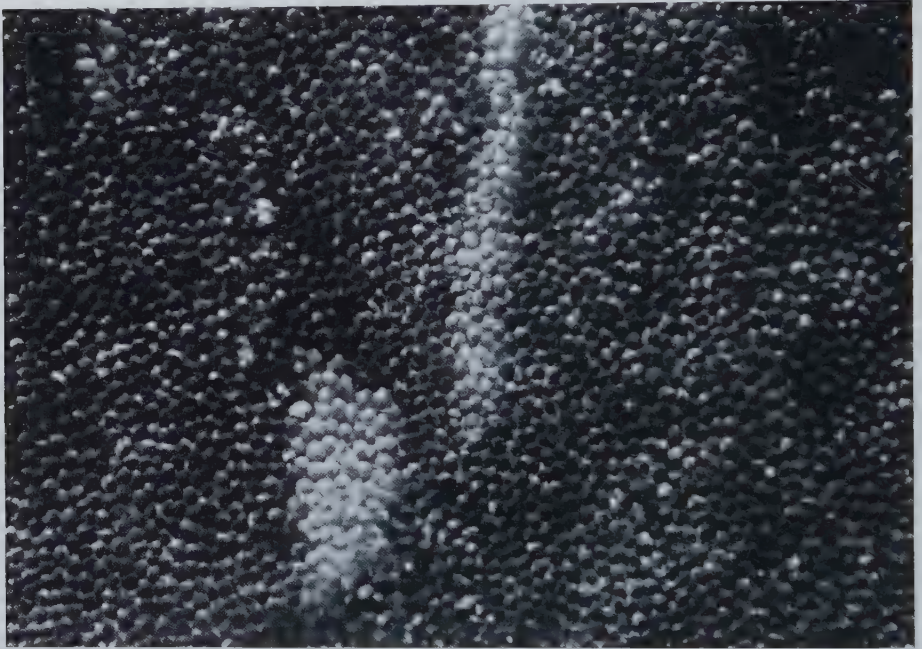


Fig. 1. Mutant spots of 60 and 80 cells on day 26. 59:1

may have two or more substrands it seems highly probable that a mutation (point or segmental damage) may occur in only one of these units and would not be able to express itself in the presence of the dominant gene on another unit. Thus one or more cell divisions could intervene before the change would affect the phenotype.

The estimated number of mutations was more or less constant up to the 27th day, when there were 19 spots containing about 200 cells each, but thereafter sampling of the limited number of flowers and the low spot frequency made the technique unreliable. It appears that there was no real change in the probability of a cell mutating in flower buds irradiated between 20 and 27 days before opening. The gross mutation rate averaged over this period was 3,833 equivalent single-cell spots in this experiment, and control plants had a spontaneous mutation rate of about 114 on the same basis. The net rate for the three loci was therefore 19×10^{-6} per cell per r (or an average of 6.33×10^{-6} per locus) so that a dose of 30 r would double the spontaneous rate if the dosage response is linear. This value is derived from a single experiment and should be regarded only as a preliminary estimate.

2. Chronic gamma irradiation experiments

Tests of the frequency of mutation in chronically irradiated plants in the gamma field have given conflicting indications of a non-linear response at low dose rates (i. e., below 6 r per 20 hour day, see Fig. 2) (SPARROW, 1954; SPARROW and POND, 1956). However, all recent tests in the gamma field and gamma greenhouse have failed to show any significantly higher mutagenic efficiency for low dose rates. These experiments confirm the previously reported influence of season, the mutation rate in September being about 50% greater than in July, but in each case linear with dose to at least 250 r/day.

Plants grown 4 months in the gamma field behaved the same as those exposed for only 1 month before analysis, so that the spot frequency apparently was not proportional to total dose at any given dose rate. Of the spots of eight or more cells counted, the majority are considered from their small size to be those which result from mutation which occurred 21–25 days before flower-opening. Future experiments will also be designed to compare the mutation frequencies of chronically irradiated plants on an equivalent basis with those from acute irradiation.

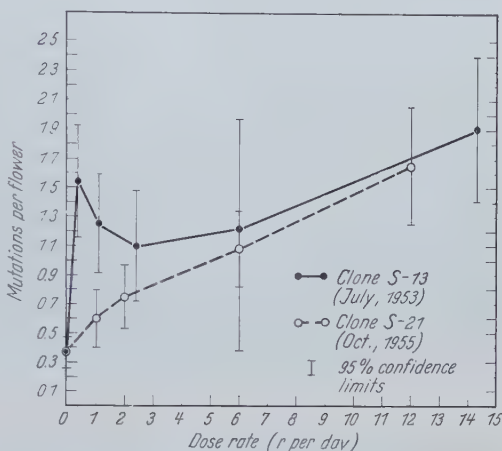


Fig. 2. Frequency of somatic mutations in two clones of heterozygous *Antirrhinum majus* after prolonged exposure to low levels of chronic gamma irradiation

3. The post-irradiation response

The spot frequency observed in plants removed from the gamma field drops off rapidly and approaches the frequency and size distribution of control plants in about 5 to 6 weeks. This might be expected since, after a minimum period, the new flowers are derived from buds which were not irradiated during the later stages of their development into flowers. However, 4 flowers out of 1836 on 23 plants contained white mutations over one quarter of a flower in size in the sixth and seventh post-irradiation weeks. Only two more have occurred up to the fifth month. In the eighth to twentieth weeks, one plant produced a branch which bore 3 half-lavender, 4 whole-lavender, and 7 normal purple flowers (Fig. 3). The mutant tissue was arranged as a sector, and was evidently caused as a single mutation early in branch ontogeny.

Over six weeks after removal from chronic gamma irradiation we observed, on separate plants, a flower sector, a branch sector, and a portion of a branch system which bore flowers showing small spots (Fig. 4) at frequencies listed in Table 1. At least two similar branch sectors appeared four months after X irradiation. Axillary branches from the mutable sector of plant number 50A1 have shown the same characteristic spotting (Fig. 5) as the parent sector, although



Fig. 3. Half-lavender flower from sectorial lavender/purple branch (normal flower right). 1.5:1



Fig. 4. Median lobe of lower lip, sectorial for "mutable" condition producing many small white and pink spots. 10:1

nine months have elapsed since irradiation was discontinued. Some of the spot frequencies were over twice as high as that obtained from the highest chronic dose rate of 285 r used in the gamma field (doses higher than 300 r per day inhibit



Fig. 5. Mutable flower (left) from axillary branch of mutable sector of plant 50 A1, and unspotted normal flower (right). 1.5:1

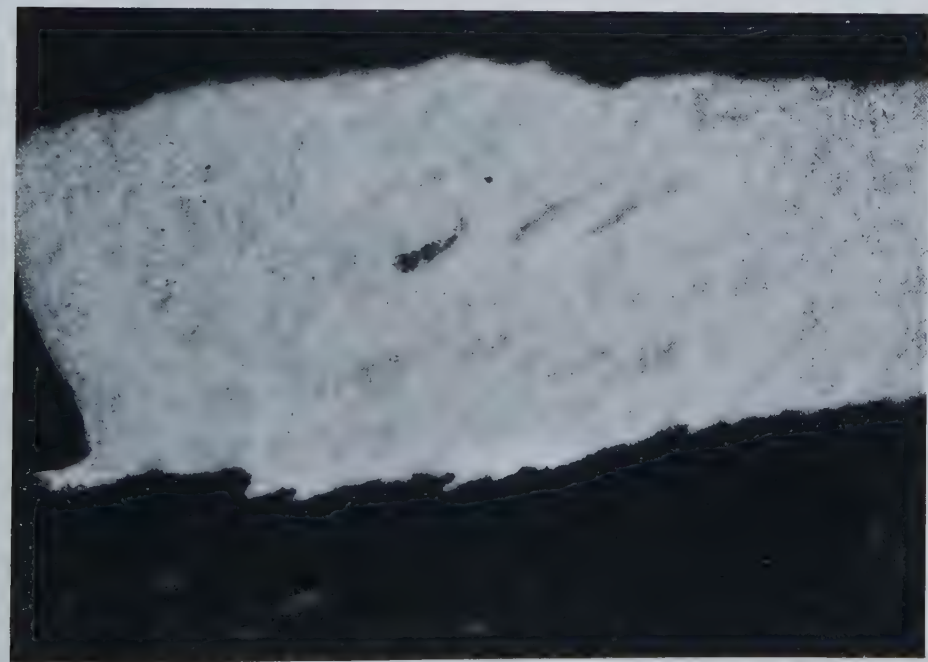


Fig. 6. Large white mutant streak showing back-mutation to red probably induced by the mutable condition. 12:1

flowering). The persistence of the high mutation rate in these flowers or sectors suggests that a mutator gene or gene complex has been produced. It is plausible that there are other occurrences of the mutable condition, causing less instability

than the more obvious ones. Their detection on individual branches would not be possible because of the large number of flowers required to establish a statistically significant difference from the spontaneous mutation rate of untreated or non-mutable plants. It is assumed that the mutable condition was induced by the gamma radiation and that it may represent some type of chromosomal change involving dissociator and activator elements as postulated by McCLINTOCK (1956) in maize. Alternatively, it could be a mutation to a dominant gene at a mutator locus causing instability. The instability may influence mutation in both directions, for a large white sector on one flower showed a purple fleck comparable in size to the numerous pink flecks in the purple part of the flower (Fig. 6).

Table 1. *Spot frequency in mutable sectors*

Experiment	Plant No.	Size of sector	No. of flowers examined	Flecks per 3 sq. cm.	
				Mean	S. E. mean
Gamma field	50 A1	Median lobe	1/12	480	—
	50 A1	Half branch	8	53.8	± 4.6
	50 A1	Three axillary branches from above	9	34.7	± 3.0
	150 B3	Branch system	35	6.8	± 0.5
X ray	30	Two flowers	2	12.5	± 2.5
	35	Half branch	5	9.6	± 1.4
Both	controls		100	1.5	± 0.1

Discussion

The occurrence of progressively larger areas of tissue showing mutant phenotype, arranged in definite cell lineages, suggests that all are attributable to mutational events. It remains to be determined whether these events are true point mutations, somatic crossovers, chromosome aberrations, nondisjunctions or possibly a combination of these processes. Selfed seed progeny will be grown from flowers of wholly mutant phenotype and cuttings taken from axillary branches in mutant sectors. Branch propagation alone would perpetuate a periclinal chimera with only the epidermis having the mutant genotype, but this genotype could not be tested readily.

It seems quite possible that information pertaining to the relative efficiency of different mutagenic treatments, applied in different stages in plant development, may be of practical value to geneticists concerned with mutation breeding of cultivated plants (see HOFFMANN, 1951; KONZAK, 1957; MacKEY, 1956).

Summary

Clonal lines of *Antirrhinum majus* heterozygous for flower color have been used to study somatic mutations induced by irradiating plants with chronic gamma rays from cobalt-60 and acute X rays. Pink or white flecks and sectors of various sizes on the purple flowers are interpreted as resulting from mutational events at different times in flower development.

Acute X-ray treatment of pre-flowering stages caused no visible change in flowers opening prior to the 15th day thereafter. On the 16th to 19th days there was dense mottling, and by the 20th or 21st day numerous eight-cell mutant spots could be counted. The number of spots induced by 1,000 r of X rays was used

to obtain a preliminary estimate of an average mutation rate for the three genes studied of 6.33×10^{-6} per cell per roentgen.

Chronic irradiation in a gamma radiation field and greenhouse showed a linear response of mutation rate to daily dose rate, the actual rate being subject to seasonal variation. There were occasional indications of non-linearity but further tests have failed to show any significantly higher mutagenic efficiency of dose rates below 6 r/day.

In plants removed from chronic gamma irradiation the frequency of mutation spots returns to the spontaneous level after about six weeks. The appearance, however, of mutant sectors on plants several months after exposure to both acute and chronic radiation indicates the induction of persistent genetic changes. Progeny tests of seeds and cuttings are planned to test the nature of these genetic events.

References

- HOFFMANN, W.: Ergebnisse der Mutationszüchtung. In: Vorträge über Pflanzenzüchtung, p. 36—53. Land- und Forstwirtsch. Forschungsrat e. V., Bonn 1951. — KONZAK, C. F.: Genetic effects of radiation in higher plants. Quart. Rev. Biol. **32**, 27—45 (1957). — MACKEY, J.: Mutation breeding in Europe. In: Genetics in Plant Breeding, Brookhaven Symposia in Biol. **9**, 141—152 (1956). — MCCLINTOCK, B.: Intranuclear systems controlling gene-action and mutation. In: Mutation, Brookhaven Symposia in Biol. **8**, 58—71 (1956). — SPARROW, A. H.: Somatic mutations induced in plants by treatment with X and γ radiation. Proc. 9. Internat. Congr. Gen. Cytologia (Pisa) **6**, Suppl., 1105—1106 (1954). — SPARROW, A. H., and V. POND: Some cytogenetic and morphogenetic effects of ionizing radiation on plants. In: Conference on Radioactive Isotopes in Agriculture, p. 125—139. U.S.A.E.C. Document No. TID 7512. For sale by Supt. of Documents, U. S. Govt. Printing Office, Washington 25, D. C. 1956. — SPARROW, A. H., and W. R. SINGLETON: The use of radiocobalt as a source of gamma rays and some effects of chronic irradiation on growing plants. Amer. Naturalist **87**, 29—48 (1953). — STUBBE, H.: Die Gene von *Antirrhinum majus*. IV. Z. Vererbungslehre **79**, 401—443 (1941).

Department of Biology, Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y.

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ÜBER DEN ERBGANG DES CRUCIATA-MERKMALS DER OENOTHEREN

VI. Mitteilung

VERBINDUNGEN DER OENOTHERA LAMARCKIANA MUT. BLANDINA*

Von

O. RENNER

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. August 1957)

Gegenüber den in der letzten Studie (V., R. 1956) behandelten heterozygotischen Arten *Oe. biennis*, *Lamarckiana*, *suaveolens* hat die *Oe. blandina* den Vorteil, daß sie, weil homozygotisch, aus den Bastarden bei Selbstbestäubung herausspaltet. Ihre Blüten sind groß, die Petala messen 45:50 mm oder etwas weniger, bei Kreuzung mit der kleinerblütigen *Oe. biennis* wird deshalb die Spaltung nach der Blütengröße (*co*—*Co*) sehr deutlich. Das ^h*blandina* oder *levans* genannte Genom bildet in der Meiose mit *rubens* von *Oe. biennis* und mit *gaudens* von *Oe. Lamarckiana* 2 freie Paare neben einem 10er-Ring, mit *albicans* von *Oe. biennis* einen 14er-Ring. Die Chromosomenformel ist nach CATCHESIDE 1.2.3.4,5.6,7.10,8.13,9.14, 11,12. — Im Habitus, mit den verhältnismäßig schwachen Stengeln, den schmalen Blättern, der lockeren Infloreszenz, der rotbraunen Kelchfärbung erinnert die Mutante viel weniger an *Lamarckiana* als an *Hookeri*; ein Bild bei R. 1943, S. 52. — Die Zahl der verarbeiteten Familien ist 154 (Nr. 288—441).

Von 1925—1940 waren 10 Generationen erzogen (R. 1943), die — von DE VRIES erhaltene — Sippe ist auch seitdem dauernd in Kultur geblieben, und in den allerdings meist sehr kleinen Familien ist nie ein Abweicher bemerkt worden; Inzuchtschäden waren nicht zu beobachten. Über einige Bastarde habe ich schon berichtet (R. 1943). Der Variabilität der Stengelfärbung in der Verbindung mit *gaudens* (l. c. S. 73) bin ich nicht weiter nachgegangen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für langjährige Unterstützung, dem Personal der Botanischen Gärten in Jena und München für Hilfe im Freiland, Herrn E. KRAUSE für die Herstellung der Photographien (in Jena war ich mein eigener Photograph).

1. Verbindungen von *Oe. blandina* Stand. mit *Oe. biennis cruciata*

Die Kreuzung *biennis cruciata* × *blandina* ist nur ein einziges Mal ausgeführt worden. Die *albilevata* war teils normalkronig (Krb. 30:41 mm), teils waren die Petala schmaler, ausgefressen bis zu intermediär (26/31 — Nr. 1811 in R. 1943, S. 98). Die Folgegenerationen werden unten beschrieben.

Der reziproke Mischling *Oe. (blandina* × *biennis cruciata*) *levorubata* wurde dreimal hergestellt, mit wechselndem Ergebnis (Tabelle 1). Das erstemal war die *levorubata* fast durchaus normalkronig (Nr. 1805 in R. 1943), später verschob sich das Verhältnis immer mehr zugunsten der cruciaten Pflanzen. Auf einem Indi-

* RICHARD HARDER zum 70. Geburtstag gewidmet.

viduum können ganz normale, intermediäre und extrem cruciate Blüten vorkommen. Abb. 1, obere Reihe.

Nach Analogie mit Erfahrungen an den *Lamarckiana*-Bastarden wurde angenommen, daß die Variation in der F_1 im wesentlichen genotypischer Art sei, aber genauere Prüfung tut not.

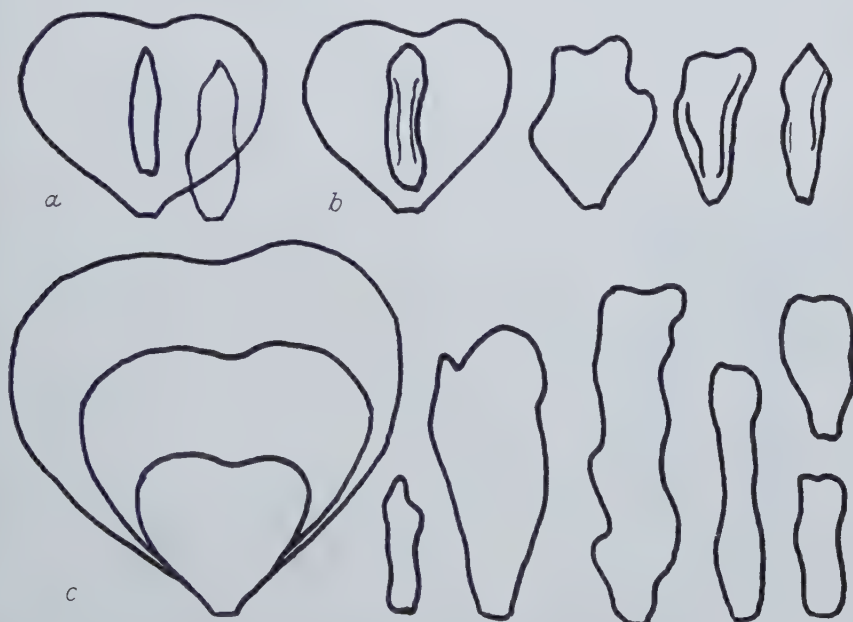


Abb. 1a—c. Petala von *Oe. (blandina* Stand. < *biennis cruciata*) *levorubata*. a u. b F_1 , 43/59 und 52/77. c *blandina* aus F_2 , 44/148, 149, 53/149, 150. Natürliche Größe

2. Die Folgegenerationen der *levorubata* und *rubilevata*

a) *levorubata* als *Cr-levans* · *cr-rubens*

In der F_2 der *levorubata* aus Selbstung waren die *blandina* zahlreicher als die *levorubata*, diese fehlten mitunter sogar ganz. Spaltung findet statt nach der Nervenfarbe (rote Nerven *R* von *rubens*, weiße *r* von *levans*, in 1.2); nach der Gestalt der Blätter und der Kelche (spitze Blätter und Blütenknospen *Sp* von *levans*, stumpfe *sp* von *rubens*, in 5.6; Abb. 2,7; vgl. dazu RENNER 1925, S. 23, Abb. 16—18, *ruviflava Sp* und *sp*), nach der Blütengröße (kleine Blüte *Co* von *rubens*, große *co* in *levans*, Austausch durch Crossing-over so häufig wie wenn ein freies Chromosomenpaar beteiligt wäre); nach der Gestalt der Kronblätter (normal *Cr*, sepalodisch *cr*, ohne strenge Alternative). Vgl. Abb. 1 untere Reihe, Abb. 3.

Tabelle 1. *blandina* × *biennis cruciata*, F_1 , und *blandina* in F_2

	Normal	Intermediär	Cruciat	Summe
<i>levorubata</i> , F_1				
26/25	20	1	0	21
43/59	5	10	3	18
52/77	1	3	26	30
<i>blandina</i> in F_2				
44/148, aus F_1 nor.	30	0	7	37
44/149, aus F_1 cruc.	1	0	31	32
53/149, aus F_1 nor.	8	7	25	45
53/150, aus F_1 cruc.	10	4	28	42

In der Tabelle 1 sind nur die *blandina* aufgeführt, die Zahlen der *rubata* sind zu klein, um etwas Wesentliches auszusagen. Bemerkenswert ist, daß eine cruciate Pflanze der F_1 von 1943 fast lauter cruciate *blandina* hervorgebracht hat, eine normalkronige Schwesterpflanze viel mehr normale als cruciate. Die Zusammensetzung dieser Familie 44/148 (aus 43/59) wäre als einfache Spaltung nach 3 *Cr*:1 *cr*, ohne Komplikation durch Konversion, zu verstehen, wenn die *Cr*-Pflanzen spitzkelchig, die cruciaten stumpfkelchig gewesen wären (vgl. unten); aber die Zahlen der Schwesterfamilie 44/149 können nur durch die Annahme



Abb. 2. Untere Stengelblätter von *blandina* aus *levorubata* F_2 , spitz und stumpf. Verkleinert

erklärt werden, die Mutter sei infolge von Konversion (fast) homozygotisch *cr* gewesen. Die starke Tendenz zu cruciat, die schon die F_1 von 1952 kennzeichnet, kommt auch in den beiden Tochterfamilien von 1953 zum Ausdruck, und aus der so gut wie gleichen Zusammensetzung der Familien 53/149 und 53/150 könnte man herauslesen, daß der phänotypische Unterschied zwischen den beiden Müttern hier nur durch modifikative Dominanzschwankung (vgl. HARTE) verursacht war; auch das Verhältnis 18 *Cr*:64 *cr* ließe sich als etwas verzerrtes Verhältnis 1:3, bei Dominanz von *cr* über *Cr*, erklären. Das Verhältnis *Sp*:*sp* ist aus den Protokollen nicht festzustellen.

Ein klareres Bild als die Selbstung gibt wie immer die Kreuzung mit einer rezessiven Sippe. Sehr geeignet hierfür ist die cruciate stumpfkelchige großblütige *blandina*, von der noch ausführlich zu sprechen sein wird. Das Ergebnis war bei Verwendung einer cruciaten F_1 -Pflanze von 52/77:2 *Sp-rubilevata* und 48 *blandina*, davon 1 *Sp* nor grbl., 19 *Sp* intermediär gr. und kl., 28 *sp cr* gr. und klein; 53/151. Die Typen der Petala zeigt Abb. 4. Das Verhältnis 20 *Sp*:28 *sp* ist von 1:1 nicht weit entfernt, und, was besonders wichtig ist, dezidiert cruciate Blüte geht mit *sp sp*, die *Sp sp* sind breit cruciat bis intermediär (ausnahmsweise normal).

Eine aus *cr-levorubata* hervorgegangene spitzblättrige normalkronige großblütige *blandina* war mit *biennis cruciata* gekreuzt worden und hatte unter 16 *levorubata* auch eine spitzblättrige normalkronige Pflanze gebracht (48/46, vgl. unten S. 20). Dieses Individuum verhielt sich bei Selbstung sehr auffällig; es brachte *levorubata* und *blandina*, beide als *Sp* und *sp*, als *Co* und *co*, als *R* und *r*, wie es sich gehört, aber alle Nachkommen waren in 2 Familien normalkronig; es waren 20 *levorubata* und 22 *blandina* in 49/120, und 80 Pflanzen (*rubata* und *blandina* nicht ausgezählt) in 50/125. Das *cr* von *rubens* war hier durch das sehr starke *Cr* von *Sp-levans* in *Cr* konvertiert. Vermutlich könnte man auch in der F_1 von *blandina* Stand. $\times$ *biennis cruciata* einzelne Pflanzen finden, deren *Cr* ähnlich konversionsaktiv ist.

Die Rückkreuzung *biennis cruciata* $\times$ *levorubata* F_1 interm. (aus 26/25) brachte 14 *albicans* · *rubens* = *biennis* und 80 *albilevata*, von beiden Formen waren die meisten Pflanzen cruciat (27/120 = Nr. 1839 in R. 1943, S. 100). Von der

biennis ist das nicht zu verwundern, aber die *albivervata*, die ja in F_1 fast durchweg normalkronig war, zeigt durch das Vorherrschen der cruciaten Kronen, daß *levans* in *velorubata* verändert ist. Es wird sich zeigen, daß die Veränderung teilweise auf Austausch, teilweise auf Konversion beruht.

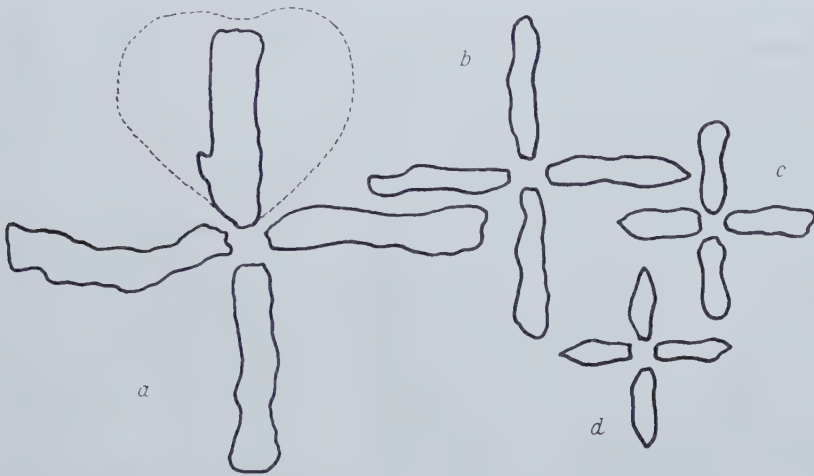


Abb. 3a—d. *blandina* aus *levorubata* F_2 . a *cr Sp sp* großblütig; b *cr sp sp* großblütig; c *cr Sp sp* kleinblütig; d *cr sp sp* kleinblütig. $\frac{2}{3}$ der natürlichen Größe, wie alle anderen Zeichnungen

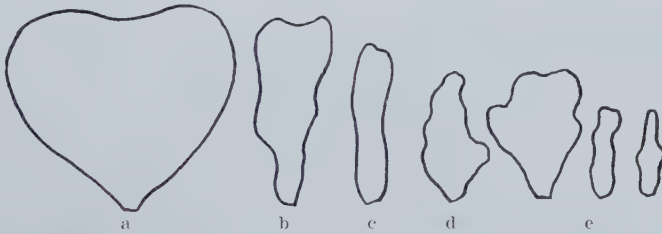


Abb. 4a—e. (*levorubata* $F_1 \times$ *blandina cr sp sp* großblütig) *blandina*. 53/151. a *Sp Cr*; b *Sp cr*; c *sp cr* großblütig; d *Sp* intermediär; e *sp cr* kleinblütig

b) *rubilevata* als *Cr-rubens* · *cr sp-levans*

Eine *rubilevata* stumpfblättrig normalkronig aus 48/50, *biennis* München $\times$ *blandina cr sp* (aus 47/7), brachte bei Selbstung in erster Saat (49/112) 10 *rubilevata* und 18 *blandina*, beide mit großen und kleinen Blüten (Krbl. 35:40 bis 27:32 mm), alle normalkronig (und stumpfblättrig), keine cruciaten. Die *blandina* gleicht, wenn großblütig, ganz dem seltenen *Cr sp*-Typus aus *Cr cr Sp sp-blandina* (vgl. unten). In zweiter Saat (50/123) waren es 39 Pflanzen, wieder alle *Cr*. Eine zweite *rubilevata* gleicher Entstehung (aus *blandina* von 49/95) brachte bei Selbstung 11 *Cr-rubilevata* und 24 *blandina*, davon 21 *Cr*, 3 cruciat; 50/85. In den 3 Familien sind es zusammen 99 normalkronige und 3 cruciate Pflanzen. Das macht Konversion des *cr* in *levans* durch das *Cr* in *rubens* wahrscheinlich. Das *cr* der cruciaten *blandina* ist also gegen das *Cr* in *rubens* der normalkronigen *biennis* schwächer als das *cr* in *rubens* der *biennis cruciata* gegen das *Cr* in *blandina* Standard.

3. Großblütige *blandina* aus *levorubata*

a) *blandina* spitzblättrig breit cruciat

Eine sehr großblütige, breit cruciate bis intermediäre, spitzkelchige, weißnervige *blandina* aus der F_2 -Familie 44/149 (diese aus cruciater *levorubata* F_1),



Abb. 5. *blandina* aus *levorubata*, großblütig breit cruciat spitzblättrig und spitzkelchig. F_7 , 50/79. Auf etwa $\frac{1}{3}$ verkleinert

wie Abb. 5, spaltete bei Selbstung nicht mehr nach der Blütengröße, wohl aber nach der Gestalt von Kelch und Krone (Abb. 6). Die *Sp*-Nachkommen waren wieder breit cruciat (Krb. z. B. 45:10 mm), oder normalkronig (Abb. 7), die *sp* waren extrem cruciat mit beträchtlich kleineren schmalen meist spitzen Petalen (30:5 mm; Abb. 8). Diese letzte Form ist weiterhin konstant, sie ist *co co sp sp cr cr*; ebenso verhält sich wenigstens zum Teil der normalkronige Typus, als *co co Sp Sp Cr Cr*; die spaltende Kombination ist *co co Sp sp Cr cr*. Auch hier geht, wenigstens im großen gesehen, *cr* mit *sp* und *Cr* mit *Sp*. Die Spaltungszahlen einiger Familien gibt die Tabelle 2.

Ganz eindeutig ist nur die Klasse *sp cr*; von den wenigen *sp Cr* wird später zu reden sein.

Unter den *Sp Cr* befinden sich, wie die Nachkommenschaften ausweisen, auch *Sp sp*-Individuen. Umgekehrt ist zu vermuten, daß *Sp cr* in *Sp homo-*



Abb. 6a—d. *blandina* großblütig aus F_4 und F_5 der *levorubata*. a *Sp Sp* normalkronig; b *Sp sp* breit cruciat; c *sp sp* streng cruciat; d *Sp* intermediär. F_4 und F_5 , 47/7 und 48/50

zygotisch sein kann, woraus sich die große Häufigkeit dieser Klasse erklären würde. Daß die Spaltung *Sp—sp* im Verhältnis 3:1 erfolgen sollte, ist nicht zu bezweifeln. Das gefundene Verhältnis 612 *Sp*:105 *sp* weist ein hohes Rezessiven-defizit auf, aber daß die stumpfblättrigen Pflanzen viel schwächer sind als die

spitzblättrigen, springt ohne weiteres in die Augen, und sie werden manchmal ganz unterdrückt werden. Die Auszählung nach *Sp*—*sp* sollte eigentlich in den Keimschalen vorgenommen werden, wo die *sp sp-blandina* geradezu rundblättrig erscheint, aber dieses Licht ist leider zu spät aufgegangen. Übrigens wird die kleine Zahl der Stumpfblättrigen nicht nur durch Elimination von Sämlingen zustande kommen, sondern auch Konkurrenz der Pollenschläuche wird daran einen Anteil haben (vgl. unten 49/76).

Das Ergebnis der Kreuzung *blandina Sp cr* $\times$ *blandina sp cr* läßt sich nach diesen Erfahrungen voraussagen. Es müssen *Sp cr* und *sp cr* entstehen, und zwar sollten sie eigentlich gleich häufig sein. In Wirklichkeit waren es 26 *Sp cr* und 15 *sp cr* (daneben eine Pflanze der seltenen Kombination *sp Cr* (Krb. 36:43 mm) in 48/53 (vgl. * bei Tabelle 2), und unter 34 *cr* mehr *Sp* als *sp* in der Schwesterfamilie 48/54.

Tabelle 2. *blandina* breit cruciat selbstbestäubt

	<i>Sp Cr</i>	<i>Sp cr</i>	<i>sp cr</i>	<i>sp Cr</i>
46/199 aus 44/149, F ₃	6 ?	12 ?	6	
47 7 aus 46/119, F ₄	51	38	13	3
48/48 aus 47/7, F ₅	6	38	10	
48/50 aus 47/7, F ₅	5	27	6	
48/52 aus 47/7, F ₅	10	43	3	
49/103 aus 48/45, F ₆	14	79	22	
50/93 aus 49/103, F ₇	5	70	5	
51/126 aus 50/93, F ₈	12	40	6	
54/68 aus 53/150, F ₃	12	66	18	
49/91 aus 48/53*, F ₆	6	11	0	
50/79 aus 49/91, F ₇	5	56	13	
Summe	132	480	102	3

* 48/53: *blandina Sp cr* $\times$ *blandina sp Cr*, beide aus 47/7, vgl. unten.

In der Kreuzung *blandina Sp cr* (aus 50/76) $\times$ *Hookeri sp cr* kleinblütig (aus 50/129) war das Verhältnis 1 *Sp*:1 *sp* recht genau verwirklicht: es waren 116 kbl. *levhookeri*, 60 *sp cr*, 56 *Sp*, davon 41 breit cruciat und 15 normalkronig; 51/129 (sic). Hier war also in der *blandina* das *Cr*-Element spürbar, das bei Selbstung am deutlichsten in der *Sp Sp*-Form zutage tritt. — Die Kreuzung *blandina Sp cr* (aus 47/7) $\times$ *Lamarckiana subcruciata* brachte 14 *levolata* und 9 *levorutina*, alle gut cruciat; 48/51. Wenn *Cr* in der *blandina* vorhanden war, konnte es sich gegen das *cr* der *Lamarckiana* nicht durchsetzen. — *blandina Sp cr* (aus 47/7) $\times$ *biennis cruciata*: 13 *levorubata*, alle streng cruciat, teils *Sp* teils *sp*; 48/49. — *blandina* Stand. $\times$ *blandina Sp cr* (aus 46/119): 80 *blandina* großblütig normalkronig, spitzblättrig, wenige mit ganz leichten Defekten, diese wohl *Sp-levans* $\cdot$ *cr sp-levans*; 47/10. — *biennis cruciata* (*sulfurea*) $\times$ *blandina Sp cr* (aus 46/119): 25 *albilevata*, alle cruciat (Krb. 20:6, 17:4 mm); sie enthalten wohl teilweise *Cr sp-levans*, aber *Sp-levans* setzt seine *Cr*-Tendenz gegen *cr* von *albicans* nicht durch: 47/9. — *biennis normal* (*sulfurea*) $\times$ *blandina Sp cr* (aus 46/119): 50 *albilevata*, meist normal (Kr. 32:38, 25:35 mm), teilweise mit leichten Defekten, an einer Pflanze sogar intermediäre bis ganz cruciate Blüten, diese sicher *albicans* $\cdot$ *sp cr-levans*; 47/8. — Das *cr* der *blandina* ist also ziemlich schwach.

b) *blandina* spitzblättrig normalkronig

Die aus *Sp cr-blandina* hervorgegangene normalkronige *blandina* (Abb. 7) erweist sich teilweise als *Sp Sp*, d.h. sie ist bei Selbstung konstant (Tabelle 3) und liefert bei Kreuzung mit *blandina sp cr* lauter *Sp*-Nachkommen, unter 56 Pflanzen 39 cruciat, 1 variierend von cruciat bis normal (Kr. 40:10 bis 45:47 mm) 16 normal; 49/85, Abb. 9b. Die *Cr* zeigen, daß normalkronig auch *Sp sp Cr cr* sein kann. — Dieselbe Pflanze brachte bei Kreuzung mit *biennis cruciata* 44 spitzblättrige *levorubata*, meist cruciat, wenige normal (Kr. 23:27 mm), auch diese teilweise etwas defekt; 49/84. — Mit *blandina cr sp* kleinblütig (aus 48/62, vgl. unten) gekreuzt lieferte dieselbe Form 41 *Sp-blandina*, ziemlich kleinblütig (Krb. 30:30, 32:32 mm), 35 cruciat bis intermediär, 6 fast normal; 49/88. (Im



Abb. 7. *blandina* aus *levorubata*. Links normalkronig spitzblättrig großblütig (Stengel längs halbiert), rechts cruciat stumpfblättrig kleinblütig (ganzer Stengel).
F₃, 46/119 und 46/102



Gegensatz dazu bringt die gleiche Kreuzung, wenn *blandina* Stand. als Mutter verwendet wird, fast nur normalkronige *blandina*; vgl. unten.)

Auf normalkronige nach *Cr—cr* spaltende *blandina* bin ich mehrmals gestoßen, wie die drei letzten Familien der Tabelle 3 zeigen. Von der Mutter der Familie 48/45 (in 47/7) ist zu sagen, daß sie einen cruciaten Seitenzweig hatte. Dieselbe Pflanze gab bei Bestäubung eines durchaus normalen Zweigs mit Pollen von *biennis cruciata* 16 *R-levorubata* teils *sp cr*, teils *Sp cr*, auch 1 *Sp Cr*; 48/46. — Daß diese normalkronige *levorubata* bei Selbstung fast nur normalkronige Kinder brachte, ist oben (S. 16) schon erörtert. — Dieselbe *Sp Cr-blandina* aus 47/7 wie oben brachte bei Kreuzung mit *Lamarckiana subcruciata* 19 *levolaeta*, 6 *Cr*, 13 *cr*, und 12 *levovelutina*, 4 *Cr*, 12 *cr*; 48/47. — Endlich wurde eine *blandina sp cr* großblütig aus derselben Familie 47/7 mit dem Pollen der *blandina Sp Cr* bestäubt; das Ergebnis waren 37 *blandina*, 28 *Sp normal*, 5 *Sp cruciat*, 4 *sp cruciat*; 49/76. Hier wird die Überlegenheit des *Sp*-gegenüber dem *sp*-Pollen deutlich.

c) *blandina* stumpfblättrig streng cruciat

Die *cr sp-blandina* (Abb. 8, 3) ist schwächer als die *Cr Sp*- und die *cr Sp*-Form, an Stengel und Früchten weniger rotbraun, weniger behaart. Die Kronblätter

Abb. 8. *blandina* großblütig cruciat stumpfblättrig und stumpfkelchig, Petala schon nicht mehr extrem cruciat, stumpf, F₇, 50/80. Auf etwa 1/3 verkleinert

waren zu Anfang ausgeprägt sepalodisch, schmal, spitz, grünstreifig, daneben erschienen aber bald auch breitere, stumpf abgestutzte, ganz gelbe Petala (Abb. 9; auch KOWALEWICZ, Abb. 22, 23). Schon in der 3. Generation (50/80) hatten einzelne Blüten Kronblätter von der halben Breite der ganz normalen (vgl. unten), und obwohl dauernd die am besten cruciaten Blüten gebeutelt wurden, war in den späteren Generationen die durchschnittliche Breite beträchtlich größer als bei den ersten, aus *levorubata* hervorgegangenen Kombinant; vereinzelt Petala können fast normal sein.

Tabelle 3. *blandina* Sp nor. selbstbestäubi

	Sp nor.	Sp cruc.	sp cruc.	sp nor.
49/90 aus 48/50	38	0	0	0
50/121 aus 48/50	13	0	0	0
48 45 aus 47/7	23	9	2	2
50 76 aus 49/85	75	4	1	12
54/70 aus 53/151	73	13	20	1

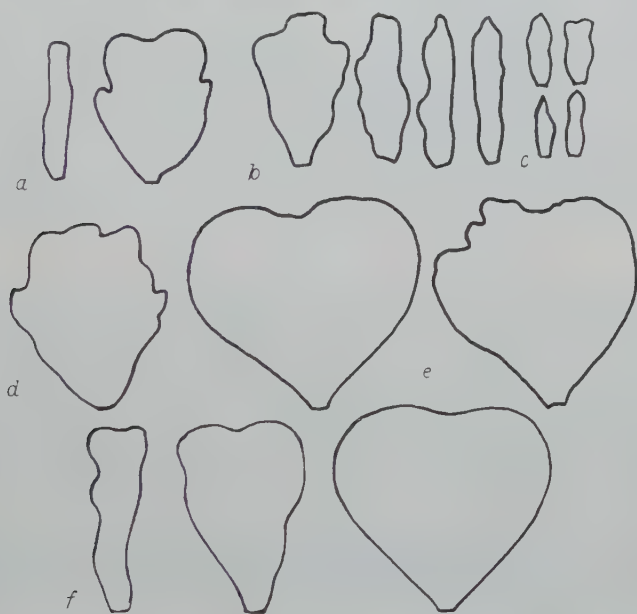


Abb. 9a—f. a u. b Großblütige *blandina* sp sp cr cr; a die Extreme in 53,118; b 4 Petala aus einer Blüte aus 53/117; c *levorubata* aus grbl. sp cr-blandina × *biennis cruciata*, 52/81; d sp cr-blandina grbl. × *bland.* Stand., am stärksten defektes Kronblatt, 51 107; e die reziproke Kreuzung, normales und besonders defektes Petalum, 48/44; f *blandina* Sp Cr abgeleitet × sp cr-blandina grbl., 49/85

Die meisten Familien enthielten nur cruciate Pflanzen, aber einige wenige Individuen stellten den normalkronigen Typus dar, der uns schon früher in der Nachkommenschaft der *levorubata* begegnet ist. Die Hauptreihe der Generationenfolge mit der Zahl der cr-Pflanzen war diese:

48/55 (+ 48/58 + 48/59, aus 47/7) → 49/93 → 50/80 + 51/131 → 52/46 + 52/45 →
 10 22 + 1 Cr 33 + 2 Cr 25 48 38 12 21
 53/117 (+ 53/118 + 53/119) → 54/64 → 56/82. Dazu kamen 50/92 aus 49/103 und
 35 23 26 100 6 100 + 1 Cr
 51/146 aus 50/93.

Das sind zusammen 4 normalkronige auf 499 cruciate Pflanzen, und dazu kommt noch eine intermediäre in 48/59. Das eine *Cr*-Individuum in derselben Familie hatte an einem Stengel *Cr*- und *cr*-Blüten nebeneinander. Von diesen normalkronigen ist im nächsten Abschnitt die Rede.

Die Kreuzung der *cr sp-blandina* mit *biennis cruciata* brachte 50 + 3 *sp-levorubata*, kleinblütig, extrem cruciat bis etwa breiter (Abb. 9c); 52/8 und 53/86. — Entsprechend mit *Lamarckiana subcruciata*: 15 streng cruciat, 11 *laeta*, 4 *velutina*; 51/149. — Mit der aus *Lamarck. subcruciata* hervorgegangenen *Cr-excruciata* (vgl. R. 1957, S. 344): 28 *levolaeta*, 20 *Cr*, Krbl. 28:28 mm, oft etwas defekt, 4 interm., 3 *cr*, und 11 *levoelutina*, 7 *Cr*, Krbl. 28:43 mm, 1 interm. 3 *cr*; 49/96. — Mit *blandina* Stand.: 14 *blandina* normal, 43:44 mm, teilweise etwas defekt (Abb. 9d); 51/107.

blandina Stand. $\times$ *blandina cr sp* (aus 47/7): 50 *Sp-blandina* meist ganz normal, Krbl. 45:50 mm, wenige mit leichten Defekten (Abb. 9e); 48/44. — *blandina* Stand. $\times$ *blandina cr sp* (aus 48/55): 32 *Sp-blandina* ohne Defekte, Kr. 43:46 mm; 49/94. — *biennis* München $\times$ *bl. cr sp* (aus 47/7): 10 *albilevata*, Kr. 32:38 mm, und 17 *rubilevata*, Kr. 28:35 mm, alle Kronen normal; 48/56. — *biennis* Mü. $\times$ *bl. cr sp* (aus 48/55): 7 *albilaeta*, 1 *rubilevata*, alle normal; 49/94. — *Hookeri* *xa* großblütig $\times$ *bl. cr sp* (aus 47/7): 41 *hookerilevata*, normal, Kr. 36:43 mm; 48/57. — *Lamarckiana* Stand. $\times$ *bl. cr sp* (aus 47/7): 25 *laeta*, 24 *velutina*, Kr. 45:55 mm; 48/119. — *Lamarck. subcruciata* $\times$ *bl. cr sp* (aus 51/131): 10 *laetilevata*, 27 *velolevata*, alle streng cruciat, Kr. 23:4 mm; *laeta* hat in der Meiose 10,2,2, *velutina* hat 6, 4 $\times$ 2; 52/84.

Das *cr* der *sp-blandina* ist ausgesprochen rezessiv und wurde deshalb viel zur Prüfung auf *Cr—cr* verwendet (schon in R. 1957). Es hat ungefähr die gleiche Valenz (vgl. R. 1942, S. 600) wie das *cr* der *Lamarckiana subcruciata*.

d) *blandina* stumpfblättrig normalkronig

Die seltene Form gleicht im Habitus ganz der cruciaten, ist schwächer und weniger behaart und pigmentiert als die *Sp*-Typen. Die Petala (Abb. 10) sind kleiner als bei *Sp*; gemessen wurden 35:40, 36:41, 38:43, 40:40 mm gegen 43:45 bis 45:50 mm der spitzblättrigen Formen; die Farbe ist etwas blasser gelb. Über das Auftreten in Nachkommenschaften von *blandina cr sp* wurde eben berichtet, über das Vorkommen in der Deszendenz von spitzblättrigen geben die Tabellen 3 und 5 Aufschluß.

Bei Selbstbestäubung erwies sich der *Cr sp*-Typus mitunter konstant, aber häufiger wurden cruciate abgespalten (Abb. 10), und auch intermediäre Individuen kamen vor. Die Tabelle 4 gibt die Übersicht.

Die Kreuzung *Cr sp-blandina* (aus 50/98) $\times$ *cr sp-blandina* (aus 50/80) brachte 37 *blandina*, fast alle normalkronig, wenige defekt bis intermediär; 51/105. Die Mutter war also *Cr Cr* gewesen, und wie so oft dominiert *Cr* nicht absolut über *cr*.

Was die Entstehung der *Cr sp-blandina* in *Sp sp Cr cr*-Familien betrifft, wird man zunächst an Crossing-over denken. Aber um ein solches kann es sich nicht handeln beim Auftreten der *Cr*-Form in *cr cr*-Familien. Und weil Versuchsfehler sich nie ganz ausschließen lassen¹, scheint ein Fall wichtig, in dem in einer solchen Familie eine Pflanze normalkronige Blüten neben cruciaten trug (48/49).

¹ Auf fraglose Fehler, die meinen Helfern beim Pikieren oder beim Auspflanzen unterlaufen waren, bin ich mehr als einmal gestoßen. Bei der Aussaat in Glasröhrchen, die viel vollständigeres Keimen gewährleistet als die Saat in Erde, wird jeder einzelne Keimling in die Schale gesetzt, in die er gehört, und daß bei dieser Prozedur, die sich über mehrere Tage hinzieht, leichter Versehen vorkommen als wenn alle Samen einer Familie in eine Schale gestreut werden, versteht sich.

Hier könnte *cr* spät zu *Cr* mutiert haben, aber ohne Prüfung der Nachkommen-schaften fehlt die Sicherheit.

In keiner einzigen der mehrförmigen Familien liegt ein normales Spaltungs-verhältnis vor. Werden aber alle spaltenden Familien zusammengeworfen und die intermediären Individuen zu den cruciaten geschlagen, so ergibt sich die Summe 336 *Cr* und 115 *cr*: das ist das Verhältnis 3:1. Unter dem Eindruck des Bildes der einzelnen Familien wird man zunächst vermuten, das sei ein Zufall. Es könnte aber doch sein, daß wirklich eine Spaltung nach 3:1 vorliegt, die nur durch die Labilität der *Cr*—*cr*-Gene überlagert ist.



Abb. 10. *blandina* großblütig stumpfblättrig normal-kronig, Abspaltung von cruciaten. 50/98

Tabelle 4. Abkömmlinge der *blandina* *Cr sp* nach Selbstung

	<i>Cr</i>	interm.	<i>cr</i>
49/86 aus 48/45	39	0	0
49/92 aus 48/53	10	0	24
50/98 aus 49/92	86	0	9
51/142 aus 50/98	27	0	0
49/97* aus 48/59	4	3	21
50/90 aus 49/97	90	7	0
51/145 aus 50/76	13	3	26
53/155 aus 52/110	7	21	1
54/76 aus 53/155	60	0	0
Summe	336	34	81

* Die verwendete Pflanze hatte, in derselben Infloreszenz, neben den *Cr*-auch *cr*-Blüten.

e) *blandina* Stand. gekreuzt mit *cr sp-blandina*

Die erste Generation der Konstitution *blandina Sp sp Cr cr* ist immer spitz-blättrig und normalkronig, höchstens mit leichten Defekten an einzelnen Blüten (Abb. 9c). Es waren 80 + 50 + 32 Pflanzen in den Familien 47/10, 48/44, 49/94, in denen *blandina* Stand. Mutter war, und 14 in der Familie 51/107 mit *blandina* Stand. als Vater. Die Kronblätter des Bastards sind so groß wie die der Standardform.

Das Verhalten bei Selbstbestäubung ist wechselnd, wie die Tabelle 5 a erkennen läßt. In den 3 ersten Familien (2 davon aus derselben Kreuzung) ist das

Tabelle 5. F_2 von *bland. Stand.* $\times$ *bland. sp cr*

	<i>Sp Cr</i>	<i>sp Cr</i>	<i>sp cr</i>	<i>Sp cr</i>
a) Selbstungen				
48/65 aus 47/10	20	4	0	0
49/79 aus 48/44	22	5	0	0
50/120 aus 48/44	105	7	0	0
Summe	147	16	0	0
50/81 aus 49/94	33	5	14	0
50/82 aus 49/94	47	5	3	2
50/83 aus 49/94	75	17	2	0
Summe	155	27	17	2
b) $F_1 \times \textit{blandina sp cr}$				
52/111 aus 51/107	56	4	49	33

cruciata-Merkmal ganz verschwunden; die stumpfblättrigen haben kleinere Petala als die spitzblättrigen (35:38, 38:43 mm gegen 48:55). Da die *sp* viel zu wenige sind (16:147 = 1:9 statt 1:3), könnte das völlige Fehlen von *sp cr* auf Elimination beruhen. Aber auch durch Kreuzung mit *Lamarckiana subcruciata* läßt sich aus der Pflanze der Familie 47/10 keine cruciate herausholen (48/66); es entstanden 15 *levolaeta* und 48 *levovelutina*, alle normalkronig (Pet. 28:33 mm; *sp* können nicht auftreten); 48/66. Jetzt ist kaum mehr ein Zweifel, daß diese Pflanze ganz zu *Cr Cr* konvertiert war.

In den 3 letzten F_2 -Familien, Nachkommen dreier verschiedener F_1 -Pflanzen, ist das Verhältnis bei Selbstung 157 Sp : 46 sp = 3,4:1, vom theoretischen nicht weit entfernt. Unter den sp sind die Cr häufiger als die cr (27 gegen 17), was als freier Austausch zwischen $Sp Cr$ und $sp cr$ verstanden werden könnte, aber doch eher auf Konversion zurückgeht.

In der F_1 -Familie 51/107 (mit *blandina* St. als Vater) wurde keine Selbstung ausgeführt, nur die Rückkreuzung mit $cr sp$; 52/111 (Tabelle 5 b; Abb. 11). Das Verhältnis $Sp:sp$ ist 89:53; ob schon bei der Embryosackbildung sp hinter Sp



Abb. 11. (*bland.* Stand. $\times$ *bland.* $sp cr$) *bland.* $Sp sp$
 $Cr cr \times$ *bland.* $sp cr$. 1 Pet. $Sp Cr$, darin $sp Cr$, dann
 $Sp cr$ (2 Pet.), $sp cr$. 52/111

in der Konkurrenz zurückbleibt, oder die $sp sp$ durch Elimination vermindert werden, läßt sich nicht entscheiden. Die Klasse $Sp cr$ stellt äußerlich den gleichen breit cruciaten bis intermediären Typus dar, der oben (Tabelle 4) analysiert worden ist. Sie enthalten wohl neben $cr sp$ aus dem Pollen ein mit Sp verbundenes geschwächtes Cr , während in den $Sp Cr$ das Cr des

Großvaters ungemindert dominiert. Die wenigen $sp Cr$ möchte man ohne Kenntnis anderer Fälle auf Crossingover zurückführen.

4. Kleinblütige cruciate *blandina*

In der F_2 von (*blandina* Stand. $\times$ *biennis cruciata*) *velorubata* kam kleinblütig cruciate *blandina* vor (Abb. 1, 3). Die erste geselbstete (rotnervige) Pflanze erwies sich als homozygotisch kleinblütig ($Co Co$), aber als $Sp sp$; die $sp sp$ Nachkom-

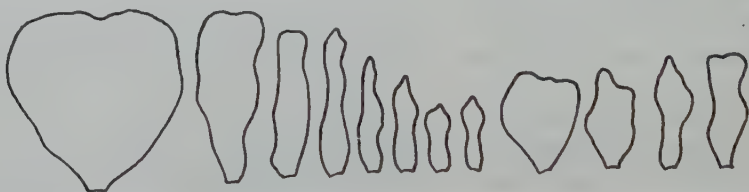


Abb. 12. *blandina* kleinblütig spitzblättrig cruciat selbstbestäubt, F_3 von *levorubata*, 54/69

men in der F_3 sind extrem cruciat (Abb. 7), die Sp haben teilweise etwas breitere Petala (46/102). Die zweite (weißnervige) Pflanze war ebenfalls $Sp sp$ und dazu $Co co$; die kleinblütigen Individuen der F_3 waren wieder dezidiert bis extrem cruciat, von den großblütigen verhielten sich die sp ebenso, die Sp waren selten schmal cruciat, öfter breit cruciat, einige intermediär bis zu fast normalkronig, wohl $Sp Sp$; 54/69, Abb. 12. Die großblütigen Kombinantanten unterscheiden sich nicht von den Nachkommen großblütiger $Sp sp cr$ -*blandina* (oben).

Die homozygotisch kleinblütigen Sp sind teilweise $Sp sp$ und spalten dann wieder, teils sind sie als $Sp Sp$ konstant, mit ziemlich breiten bis intermediären Petala. Bei Kreuzung mit *biennis cruciata* als Vater fällt die *levorubata* natürlich durchweg cruciat aus (48/69). Nach Bestäubung mit dem Pollen einer normalkronigen *biennis sulfurea* war die *levorubata* normal (47/12). Aber bei Verwendung

derselben *biennis* als Mutter war die *albilevata* nur teilweise normal, zum anderen Teil intermediär bis cruciat (47/13), und ebenso verhielten sich *albi-* wie *rubilevata* aus *biennis* München als Mutter (49/102). Das *cr* der kleinblütigen *blandina* ist also recht stark.

Die *levorubata* aus *blandina* $\times$ *biennis* oder reziprok ist teils *Sp* teils *sp*, wenn die Mutter *Sp sp* war. Die Blütengestalten lassen sich hier sicherer unterscheiden

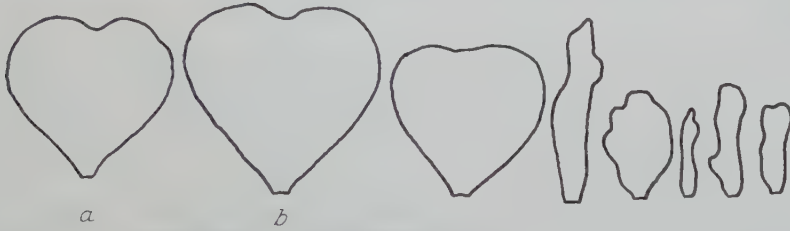


Abb. 13a u. b. a *bland.* Stand. $\times$ *bland.* kleinbl. *sp cr*, F_1 , 47/14. b Typen der F_2 , 49/77

als bei *blandina*, und das ist wichtig, weil durch die Verbindung mit *biennis* ganz sichergestellt ist, daß die cruciate kleinblütige *blandina Sp Sp* sein kann. — Eine normalkronige *Sp-levorubata* aus *Sp sp cr-blandina* $\times$ *Cr-biennis sulfurea*, also als *cr-levans* $\cdot$ *Cr-rubens* entstanden, brachte bei Selbstung viel mehr *Cr-* als *cr-blandina* (48/70); der Befund ist nicht eindeutig.

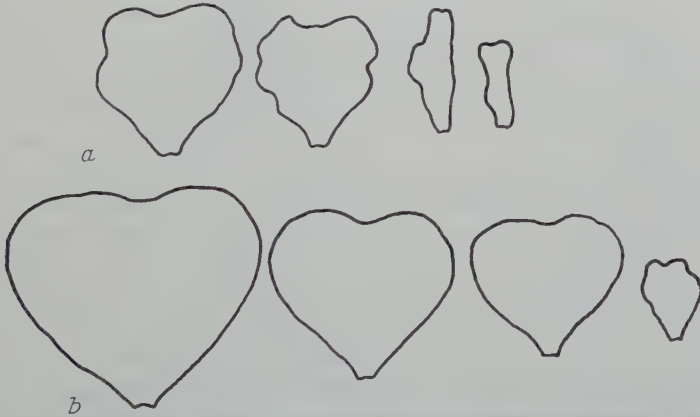


Abb. 14a u. b. a *blandina* grbl. *Sp Cr* abgeleitet (aus 48/45) $\times$ *blandina* kleinblütig *sp cr* (aus 48/62): *blandina* mittelblütig defekt bis cruciat; 49 88. b Typen der F_2 , 50 104

Die aus *blandina* Stand. $\times$ *blandina cr sp* klbl. gewonnene *blandina* hat mittelgroße Blüten (35:37 mm), meist ganz normal, teilweise defekt; 47/114, Abb. 13a. In der F_2 trat Spaltung nicht nur nach *Co—co* und *Sp—sp*, sondern auch nach *Cr—cr* ein (49/77, Abb. 13b), wie bei einem Teil der Abkömmlinge aus der Verbindung der *blandina* St. mit großblütiger *cr-blandina*. — Eine großblütige *Sp Cr-blandina*, die aus cruciater abgespalten war, brachte mit *cr sp-blandina* kleinblütig gekreuzt im wesentlichen cruciate F_1 , wie zu erwarten, aber doch auch einige normalkronige (49/88, Abb. 14a). Die F_2 aus einer solchen *Cr-Pflanze* war überraschenderweise fast ganz normalkronig (50/104, Abb. 14b).

Im folgenden sind die Zahlen der besprochenen Familien mitgeteilt. *blandina cr sp* klbl. selbst: a) 23 *cr sp* (48/62 aus 47/11); b) nochmals gesät 48 *cr sp* (49/100); c) 32 *cr sp* (48/68 aus 47/11).

blandina cr Sp sp klbl. selbst: 36 *cr*, meist *Sp*, Petala meist breit abgeschnitten, 20:4 mm, wenige *sp*, spät schossend, extrem cruciat, Petala spitz, 16:3 mm (46/102 aus 44/49); b) 20 *cr*, 17 *Sp*, 3 *sp* (47/11 aus 46/102); c) 39 *cr*, 33 *Sp*, 6 *sp* (48/67 aus 47/11); d) 145 *cr*, 89 *Sp* klbl. cruc., 33 *Sp* grbl. cruc. bis interm., 16 *sp* klbl. cruc., 7 *sp* grbl. cruc.; 54/69 (aus 53/150. — In den 3 Familien zusammen ausgezählt 162 *Sp* und 32 *sp*, wie 5:1.

blandina cr Sp Sp selbst: a) 11 *Sp*, Petala ziemlich breit (47/12a aus 46/102); b) 57 *Sp*, Pet. 21:7, 24:7 mm (49/104 aus 48/67).

blandina cr Sp Sp (aus 46/102) × *biennis* nor. *sulfurea*: 11 *levatorubata Sp* nor.; 47/12. — *blandina cr Sp sp* (aus 47/11) × *biennis cruciata*: 38 *cr-levatorubata*, *Sp* und *sp*; 48/69.

biennis nor. *sulf.* × *blandina cr Sp sp* (aus 46/102): 24 *albivata*, 17 *Cr*, 7 interm. bis zu extrem cruc., aber auch bis zu fast normal; 47/13. — *biennis* München × *cr-blandina sp* cruc. (aus 48/62): 4 *albivata*, 1 nor. (Krb. 25:32 mm), 3 streng cruc. (20:5 mm), und 16 *sp-rubilevata*, 9 nor. (Kr. 25:28 mm), 6 interm., 1 streng cruc; 49/102.

levatorubata nor. (aus 47/12) selbst: 28 *blandina*, *R* und *r*, 25 *Sp* nor., 3 *sp* cruc.; 48/70.

blandina Stand. × *blandina cr sp* klbl. (aus 46/102): 26 *blandina* nor. (Krb. 35:37 mm), teilweise defekt; 47/14. — Diese *blandina* selbst: 45 *blandina*, 24 nor. (Krb. 40:43, 33:38 mm), 19 cruc., mehr *sp* als *Sp*, meist klbl., 1 grbl., 2 kl. interm. bis zu nor.; 49/77. — *blandina* grbl. nor. *Sp* (aus 48/45) × *blandina klbl. cr sp* (aus 48/62): 41 *Sp-blandina*, meist interm., teilw. bis cruc., 6 nor. (Krb. 32:32, 30:30 mm, meist einzelne Blüten defekt; 49/88. — Eine solche *blandina* nor. (Kr. 30:30 mm) selbst: 80 *blandina*, viele *Sp* nor. (Krb. 47:55, 37:41, 30:34 mm) wenige *sp* klbl. interm. (Kr. 13:10 mm); 50/104.

5. *Laetilevata* und *levolaeta*

Die Verbindung *gaudens · levans* ist von *rubens · levans* in der Struktur wenig verschieden. Wird *Lamarckiana* normalkronig mit *blandina cr sp* großblütig gekreuzt, so steht dem 5.6-Chromosom mit *Sp Cr* von *gaudens* ein 5.6 mit *sp cr* von *levans* gegenüber. Die Spaltung wird also ähnlich ausfallen wie in der Verbindung *Sp Cr-levans · sp cr-rubens*. — *Lamarckiana* × *blandina* liefert sattgrüne *laetilevata* und erst blasse, später gut grüne *velolevata*, beide sehr großblütig. Wird *Lamarckiana* Stand. mit *cr sp-blandina* großblütig gekreuzt, so sind beide Zwillinge ganz normalkronig, ohne Defekte; es waren 25 *laeta* und 24 *velutina* in 49/119. — Dient die aus *albilaeta cruc.* × *albivelutina cruc.* hervorgegangene normalkronige *Lamarckiana* als Mutter, so sind *laeta* wie *velutina* öfter breit cruciat oder intermediär als normal: es waren 17 *cr-* und 3 *Cr-laeta*, und dazu 16 *cr-* und 9 *Cr-velutina* in 49/140 (schon mitgeteilt in R. 1957, S. 377); Abb. 15.

Laetilevata beider Herkunft wurde selbstbestäubt; die Mutter der Familie a war normalkronig, die von b war breit cruciat. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 6.

Tabelle 6. F_2 verschiedener *laetilevatae* aus Selbstung

	<i>laetilevata</i>				<i>blandina</i>			
	<i>Sp Cr</i>	<i>Sp cr</i>	<i>sp cr</i>	<i>sp Cr</i>	<i>Sp Cr</i>	<i>Sp cr</i>	<i>sp cr</i>	<i>sp Cr</i>
a) 50/96 aus 49/119	24	0	4	1	61	0	2	3
b) 50/99 aus 49/140	11	21	7	0	7	15	6	0
c) 50/75 aus 49/78	12	0	—	—	60	0	—	—
d) 54/46 aus 53/93	28	0	0	4	19	0	0	8
e) 54/47 aus 53/93	21	1	0	5	19	7	3	0

Maße der Kronblätter in F_1 49/140: *laeta* 50:55, 44:15 mm; *velutina* 52:62, 47:20, 45:12 mm. In 49/119 fehlen die schmalen.

In F_2 wurden gemessen: *laeta* *Sp Cr* 47:51, *sp Cr* 37:42, *sp cr* 32:8 mm, *blandina* *Sp Cr* 43:45, *sp cr* 33:4 mm in 50/96. — *laeta* *Sp Cr* 49:50, *Sp cr* 45:12, *sp cr* 32:7, Ausnahmeblüte *sp Cr* 35:41, *blandina* *Sp Cr* 42:46, *Sp cr* 42:14, *sp cr* 32:6 mm in 50/99.

Am klarsten liegt der Fall b (Abb. 16b). Es scheint Spaltung in $11 + 7 = 18$ *Sp Sp*, $21 + 15 = 36$ *Sp sp* und $7 + 6 = 13$ *sp sp* vorzuliegen; wären die *sp sp* 18

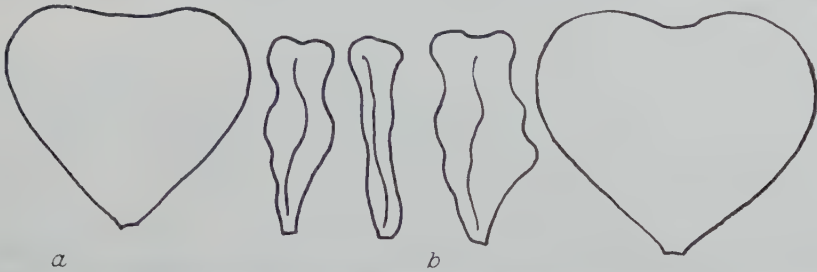


Abb. 15a u. b. *Lamarckiana* abgeleitet großbl. normalkronig leicht defekt (aus 48/33) $\times$ *blandina* *sp cr* großbl. (aus 48/55). a *laetilevata*, b *velolevata*. 49/140

statt 13, so wäre das Verhältnis 1:2:1 ideal verwirklicht. Die Form verhält sich wie die breit cruciate *blandina*, *cr* geht mit *sp*, *Sp cr* ist breit cruciat. — In der Familie a¹ (Abb. 16a), mit *gaudens* Stand., sind *Sp Cr Sp Cr* und *Sp Cr sp cr*

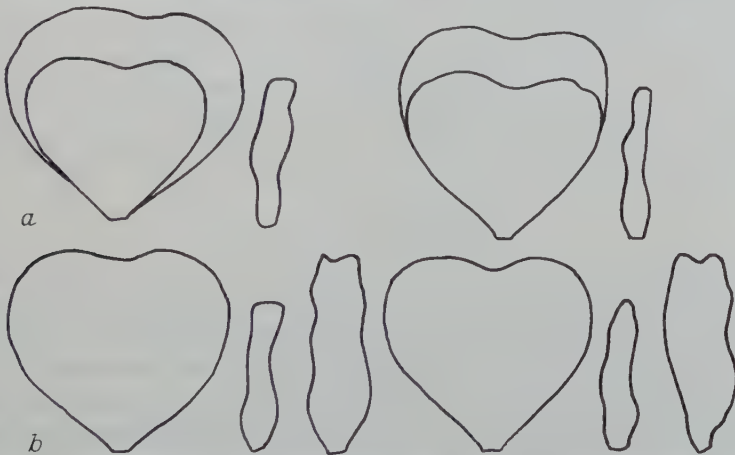


Abb. 16a u. b. F_2 der *laetilevata*. a Aus *Lamarckiana* Stand. (50/96); b aus abgeleiteter *Lamarckiana* (50/99). Links jeweils *laeta*, rechts *velutina*

nicht zu unterscheiden, die Klasse *sp nor.*, die in der zweiten Familie fehlt, kommt vielleicht durch Konversion von *cr* in *Cr* zustande, weil das *Cr* von *gaudens* Stand. stärker ist als das der abgeleiteten *Lamarckiana*. Wenn *sp Cr* durch Crossing-over entsteht, müßte dieser Vorgang sich wohl auch in der *laetilevata* der Fam. 50/99 ereignen, aber das Fehlen von *sp Cr* sagt nicht viel, weil die Zahlen zu klein sind. Eher spricht für unsere Annahme die Beobachtung, daß einige Blüten einer *laeta* in dieser Familie normale Petala hatten; hier könnte also ausnahmsweise und sehr spät die Mutation von *cr* in *Cr* eingetreten sein.

¹ In dieser Familie trat eine durch Plastidenmutation weißscheckige *blandina* auf, die SCHÖTZ (1954) zu seinen Studien über Plastidenkonkurrenz verwendet hat.

In die Tabelle 6 ist als c auch das Ergebnis eines Versuchs aufgenommen, über den schon früher berichtet wurde (R. 1957, S. 362). Eine aus *blandina* Stand. $\times$ *albilaeta* cruciat großblütig gewonnene *Cr-levolaeta* brachte bei Selbstung nur normalkronige *laeta* und *blandina* (50/75); hier war das schwache *cr* der *albilaeta* ganz in *Cr* konvertiert. Stumpfkelche können nicht auftreten, weil *gaudens* wie *levans* *Sp* besitzt, aber die 5 *Sp* 6-Chromosomen werden sicher zwischen den beiden Komplexen ausgetauscht, und unter den 60 *blandina* wären etwa 15 *cr* zu erwarten, wenn *cr* unverändert vorhanden wäre.

In weiteren Versuchen wurden *cr Sp-gaudens* und *Cr sp-levans* kombiniert, zum Zweck der Prüfung, ob jetzt *cr* mit *Sp* geht. Derselbe großblütige cruciate *albilaeta*-Stamm wie vorher (vgl. R. 1957) wurde mit normalkronig stumpfblättriger *blandina* gekreuzt. Die verwendete Pflanze war leider nicht homozygotisch in *Cr*, wie ihre Nachkommenschaft aus Selbstbestäubung zeigte (Fam. 53/155, Tabelle 4). Aber es entstanden doch vorwiegend normalkronige Nachkommen, nämlich von 43 *albilaeta* 26 *Cr*, 14 interm., 3 cruc., und von 48 *laetilevata* 39 *Cr*, 9 interm. (53/93). Bei Selbstung brachte eine ganz normalkronige *laetilevata* nur normalkronige *F*₂ (54/46, d in Tabelle 6), das schwache *cr* der *albilaeta* unterlag also auch gegenüber dem *Cr* der *sp-blandina*. So konnte nicht ermittelt werden, ob *Cr* mit *sp* gekoppelt ist und *cr* mit *Sp*. Die Nachkommenschaft einer intermediären *F*₁-Pflanze spaltete in unübersichtlicher Weise (54/47, e in Tabelle 6); die Gestalten der Petala waren die gleichen wie in Abb. 16.

Derselbe Versuch wurde mit einer kleinblütigen cruciaten *albilaeta* (vgl. R. 1957, S. 364) wiederholt. Die Kreuzung *cr Co-albilaeta* $\times$ *Cr co sp-blandina* brachte 4 streng cruciate *albilevata* und 8 *laetilevata*, teils intermediär teils cruciat (53/98). Die Variabilität der *F*₂ aus Selbstung und aus Rückkreuzung mit *cr sp-blandina* war sehr undurchsichtig, wohl infolge der Labilität der *Cr*-Gene in beiden Komplexen (54/50, 54/51).

Über die Kreuzung von *blandina* Stand. mit *Lamarckiana subcruciata* ist schon kurz berichtet (R. 1957, Nr. 16, 40). Die *F*₁ war normalkronig, die *F*₂ der *levolaeta* bestand aus 15 *Cr-laeta* und 24 *Cr-blandina* (teilweise etwas defekt). *Gaudens* der *Lamarckiana subcruciata* muß das *cr* im 5. 6-Chromosom führen, es sollte also Spaltung nach *Cr*—*cr* möglich sein. Da sie nicht in Erscheinung trat, wird das schwache *cr* von *gaudens* zu *Cr* konvertiert gewesen sein.

6. Velolevata und levovelutina

Die Verbindung *velans* · *levans* hat 3 Paare (1.2, 3.4, 11.12) und einen 8er-Ring; so auch bei Verwendung von *cr sp-blandina* gefunden.

Wie oben (S. 22) mitgeteilt, ist die *velolevata* aus *Lamarckiana* Stand. $\times$ *cr sp-blandina* ganz normalkronig. Bei Selbstung lieferte sie viele ebensolche *Sp-velolevata* (59 Pflanzen) und wenige *sp-blandina*, davon 3 cruciat, 1 intermediär, 1 normal; die letzte dürfte *Cr cr* gewesen und könnte durch Konversion entstanden sein. 50/49.

Aus *R-Lamarckiana* cruciat mittelblütig $\times$ *cr sp-blandina* ging unter anderem cruciate großblütige *r-velolevata* hervor (1957, S. 376). Eine solche brachte bei Selbstung 3 *sp-blandina* cruciat und 34 *velolevata*, davon 28 cruciat (Krb. 40:8 mm), 6 normalkronig (Krb. 53:60 mm), aber an einzelnen Blüten mit leichten Defekten; 49/108. Wieder besteht bei der großblütig cruciaten Verbindung die Tendenz, in normalkronig überzugehen.

Gut cruciate *levovelutina* war, neben normalkroniger, gewonnen aus *cr sp-blandina* $\times$ *Lamarckiana excruciat* (oben S. 22). Eine solche brachte bei Selbstung 11 *sp-blandina* streng cruciat und 41 *levovelutina*, davon 38 streng cruciat, 3 normal, alle Formen teils groß- teils kleinblütig; nachträglich hatte sich also teilweise das *Cr* der *Lamarck. excruciat* auf dem Weg der Reversion wieder durchgesetzt. 50/86. — Eine großblütige *Cr-levovelutina* aus dieser Familie lieferte bei

Selbstung 30 *levorelutina* und 2 *sp-blandina*, alle normal ohne Defekte. 51/144. — Dieselbe Pflanze $\times$ *cr sp-blandina*: 18 *velolera* und *blandina*, 12 nor., 4 cruc., 2 intermediär; also das *Cr* teilweise recht schwach. 50/151.

7. Die Folgegenerationen der *albivatae*

a) *albivata* aus *biennis cruciata* $\times$ *blandina* Stand.

Über die F_1 vgl. oben S. 14. Bei Selbstung entstanden wenige (3) *albivata* und viele (49) *blandina*, alle normalkronig, mit verschiedenen großen Blüten. 27/117 = Nr. 1818 in R. 1943, S. 98. Ob *albicans* noch *cr* besaß oder zu *Cr* konvertiert war, ist nicht geprüft. Der *levans*-Komplex tauscht mit *albicans* auf dem Weg des Crossing-over wohl *co* gegen *Co*, aber er scheint *cr* nicht aufzunehmen. Dieselbe Erfahrung ist auch an *albicans* $\times$ ^h*Hookeri* gemacht, worüber später berichtet wird. — In der Meiose hat *albivata* den 14er-Ring (geprüft an 50/84 und 50/63), wie 1943, S. 74, aus den Formeln abgeleitet war.

b) *albivata* aus *biennis* normalkronig $\times$ *blandina* cruciat großblütig

α) *Oe. biennis* München gibt mit *blandina cr sp co* gekreuzt recht großblütige *Sp-albivata* (Krb. 32:40, 35:43 mm) und kleinerblütige *sp-rubivata* (Krb. 27:35 mm), beide Zwillinge durchaus normalkronig; in 48/56 und 49/95 zusammen 17 *albata* und 18 *rubata*. Die geringere Blütengröße der *rubata* hängt wohl mit dem Besitz von *sp sp* zusammen.

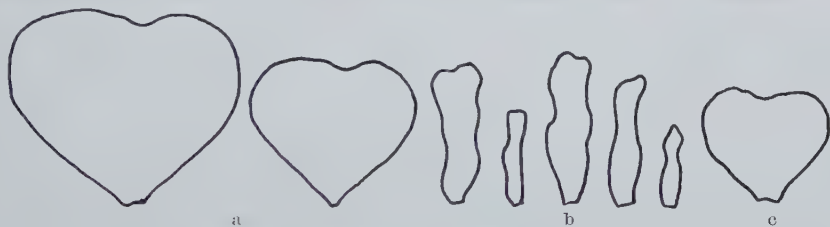


Abb. 17a–c F_2 von *albivata* normalkronig aus *biennis* München $\times$ *blandina sp cr* grblütig.
a *albivata*; b u. c *blandina*. 50/84 und 49/111

27:35 mm), beide Zwillinge durchaus normalkronig; in 48/56 und 49/95 zusammen 17 *albata* und 18 *rubata*. Die geringere Blütengröße der *rubata* hängt wohl mit dem Besitz von *sp sp* zusammen.

Aus selbstbestäubter *albivata* gehen hervor: *albivata* normal, intermediär und cruciat, und *sp-blandina* cruciat und normal (Abb. 17). Es scheint also, daß das *Cr* von *albicans* in *cr* übergehen kann, und das *cr* von *levans* in *Cr*. Der Vergleich mit der *albivata* aus *blandina* Stand. macht es wahrscheinlich, daß der „Übergang“ auf Konversion beruht.

Die Zahlen waren in zwei geprüften Familien sehr verschieden. a) 14 *albivata*, davon 12 normal (Krb. 33:40, 38:48 mm), 2 kleinblütig intermediär, und 12 *sp-blandina*, 8 normal, 4 cruciat. 49/111. — b) 14 *albivata*, 8 *Cr* (Krb. 43:52, 32:37 mm), 1 intermediär, 5 cruciat, und 54 *sp-blandina*, alle cruciat, 45 klbl., 9 grbl. (Krb. 18:3,5 und 34:10 mm); 50/84. — In der Familie a ist die Tendenz zu *Cr* stärker, in b hält sich *cr* entschieden.

β) Eine abgeleitete *biennis sulfurea* normalkronig wurde mit breit cruciater *Sp sp-blandina* gekreuzt. Die *albivata* (50 Pflanzen) waren fast alle *Cr* (Krb. 32:38 mm wohl *Sp Sp*, 23:35 mm wohl *Sp sp*), nur 1 kleinblütige war intermediär bis cruciat; 47/18 aus *blandina* 46/119. — Eine kleinerblütige *albivata* gab bei Selbstung 1 nor. grbl. *albivata* und 22 *sp-blandina*, davon 20 *cr*, 1 gemischt *cr* und *Cr*, 1 ganz *Cr*. Das *cr* von *levans* geht also mit geringer Häufigkeit in *Cr* über,

und zwar, wie die sektorial verschiedene Pflanze zeigt, durch Mutation. 48/60. — Eine größerblütige *albilevata* gab bei Selbstung nur normalkronige Nachkommen, alle *Sp*, enthielt also *Sp Cr-levans*. Es waren 10 *albata* (Krbl. 36:45, 28:35 mm) und 25 *Sp-blandina* (Krbl. 35:43, 23:27 mm). 48/61. — Zwei *blandina* aus dieser Familie brachten bei Selbstung nur *Cr Sp-blandina* (Krbl. von 50:50 bis 37:40 mm; 49/98 und 49/99. Das *Sp-levans* enthielt also keine *cr*-Elemente mehr, obwohl es aus einer cruciaten *velorubata* stammte, es war ganz zu *Cr* zurückmutiert.

γ) *biennis cruciata sulfurea* brachte mit derselben breit cruciaten *Sp sp-blandina* aus 46/119 gekreuzt lauter cruciate *albilevata* (35 Pflanzen, Krbl. 20:16 und 17:4 mm); 47/9. — Die F_2 aus einer kleinblütigen *albata* waren alle extrem cruciat, 6 *albilevata* und 37 *sp-blandina*; 48/63. — Die F_2 einer größerblütigen *albata* war teils *cr* teils *Cr*, die Mutter hatte also *Sp Cr-levans* erhalten. Es waren

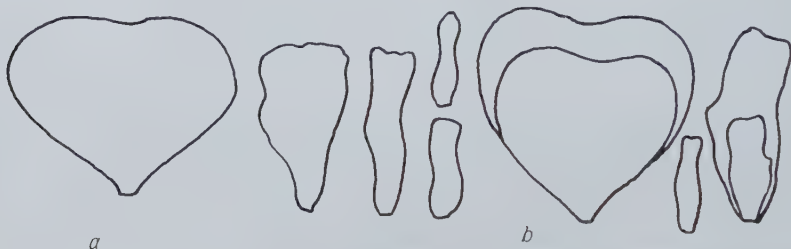


Abb. 18a u. b. F_2 von *albilevata* cruciat aus 47/9: *biennis cruc. sulfurea* $\times$ *blandina Sp sp cruc. großbl.*; a *albilevata*; b *blandina*. 48/64

6 *albilevata*, 2 *Cr*, 4 *cr*, und 29 *Sp-blandina*, 5 *Cr* grbl., 24 *cr* klbl. (Krbl. 22:4 mm); 48/64, Abb. 18. Das noch labile *Cr* von *levans* war also größtenteils wieder in *cr* konvertiert. — Eine grbl. fast normalkronige *albilevata* aus dieser Familie brachte bei Selbstung 6 *Cr-albilevata* (Krbl. bis 47:55 mm) und 12 *Sp-blandina*, davon 11 normal, 1 intermediär; 49/113. Ein Rest von *cr*-Tendenz war also hier noch vorhanden.

c) *albilevata* aus *biennis* normalkronig $\times$ *blandina* cruciat kleinblütig

Eine *biennis sulfurea* normalkronig wurde mit *cr Sp sp-blandina* kleinblütig (aus 46/102, vgl. S. 26) gekreuzt, und es entstanden 24 *albilevata*, davon 17 ganz normal (Krbl. 27:37 mm), 3 intermediär, 4 ganz cruciat (Krbl. 16:5 mm); 47/13, Abb. 19a. — Von dieser Familie wurden 3 Individuen geselbstet und eines mit *cr sp-blandina* großblütig gekreuzt, und mit Nachkommen dieser Familien wurde ebenso verfahren. Die Übersicht geben die Tabellen 7 und 8. Petala von *blandina* in einer F_2 (49/115) aus normalkroniger F_1 stellt Abb. 19b dar.

Tabelle 7. F_2 und F_3 von *albilevata*

	<i>albilevata</i>		<i>blandina</i>		
	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	
49/107 aus 47/13, <i>alb. nor. selbst</i>	24	4	7	5	<i>Sp</i>
48/72 aus 47/13, <i>alb. fast nor. selbst</i>	3	0	0	19	<i>sp</i>
48/75 aus 47/13, <i>alb. cruc. selbst</i>	0	17	0	9	<i>sp</i>
49/115 aus 48/72, <i>alb. nor. selbst</i>	1	0	8*	17	<i>sp</i>
49/116 aus 48/73 (Tabelle 8), <i>alb. nor. selbst</i> .	2	0	4	14	<i>sp</i>

Tabelle 8. *albivata* $\times$ *cr sp-blandina* großblütig

	<i>albivata</i>		<i>blandina</i>		
	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	
48/73, <i>alb. nor.</i> aus 47/13 $\times$ <i>bland.</i>	2	4	2	20	<i>Sp</i>
48/74, <i>alb. nor.</i> aus 47/13 $\times$ <i>bland.</i>	3	6	1	11	<i>Sp</i>
49/117, <i>alb. nor.</i> aus 48/73 $\times$ <i>bland.</i>	3	6	5*	24	<i>sp</i>

Einige Pflanzen sektorial von normal bis zu cruciat variierend.

Für das Ergebnis der Selbstbestäubungen ist hervorzuheben: 1. Normal-kronige *albivata* F_1 und F_2 bringen normale und cruciate Nachkommenschaft, cruciate F_1 bringt nur cruciate. 2. Ob *sp*- oder *Sp-levans* zugegen ist, macht keinen Unterschied. 3. Konversion findet statt bei *albicans* von *Cr* zu *cr* und bei *levans* von *cr* zu *Cr*. — Die Kreuzungen mit *blandina cr sp* großblütig bestätigen diese Befunde. Zu der letzten Familie, 49/117, ist noch zu bemerken, daß die *Cr*-Pflanzen, *albata* wie *blandina*, großblütig waren (*albata* 44:50, *blandina* 37:43 mm), die cruciaten meist kleinblütig (25:5 mm). Hier tritt wieder die Begünstigung der *cruciata*-Prägung durch die Kleinblütigkeit zutage.



Abb. 19a u. b. a *albivata* F_1 aus *biennis nor. sul-furea* $\times$ *blandina cr Sp sp* kleinbl., 47/13; b *blandina* in F_2 von *albivata* *nor.*, 49/115

Besprechung

Die Analyse der *levorubata* aus *blandina* Stand. $\times$ *biennis cruciata* hat wahrscheinlich gemacht — mit voller Strenge ist der Beweis nicht erbracht —, daß *cr* mit *sp* von *rubens* gekoppelt ist, also in 5.6 liegt. Ohne Konversionsvorgänge müßte der Erbgang des *cruciata*-Merkmals hier also leicht zu verfolgen sein, weil *levans* 5 *Sp* 6 besitzt. Aber schon die F_1 der Kreuzung zeigt, daß Konversion auch hier ihr Wesen treibt, und dadurch muß die Rekombination von *cr*—*Cr* wie sonst verschleiert werden. Weil in den Folgegenerationen die *levorubata* in sehr geringer Häufigkeit auftritt, sind nur die herausgespaltenen *blandina*-Formen weiter untersucht worden, und die komplexhomozygotische Beschaffenheit der *blandina* (= *levans* $\cdot$ *levans*) erleichtert die Einsicht gegenüber den Komplikationen, die sonst die Komplexheterozygotie mit sich bringt.

Wenn die Vorstellung zu Recht besteht, daß die cruciaten Individuen der F_1 der (*Cr* $\times$ *cr*)-Kreuzungen durch Konversion fast homozygotisch in *cr* sind, bei *levorubata* neben genuinem *cr* in 5 *sp* 6 ein *cr_c* (= *cr* konvertiert; 1942, S. 602, *cr'* genannt) in 5 *Sp* 6 besitzen, sollte aus cruciater *levorubata* bei Selbstung nur cruciate *blandina* (und ebensolche *levorubata*) hervorgehen. In Wirklichkeit sind, um zunächst bei den großblütigen *co co-blandinae* zu bleiben, zwar die stumpfblättrigen, die ja das 5 *sp cr* 6-Chromosom doppelt in sich tragen, meist streng cruciat, wie zu erwarten. Von den spitzblättrigen *blandinae* dagegen sind nur die durch ihre spaltende Nachkommenschaft als *Sp sp* ausgewiesenen Pflanzen cruciat (bis intermediär), die *Sp Sp*-Kombinanten sind meist normalkronig. In dem 5 *Sp* 6-Chromosom der *Sp*-Homozygoten ist also das in der F_1 durch Konversion entstandene *cr_c* zu *Cr* zurückmutiert. Dieses *Cr_r* (= *Cr* revertiert) ist aber großenteils

nicht so stark wie das genuine *Cr* der *blandina* Stand. und unterliegt dann leicht gegen genuines *cr*, besonders wenn dieses mit *Co* verbunden ist wie in *rubens* der *biennis cruciata* und in *sp cr-blandina* kleinblütig. Sogar in der Kreuzung *Sp Sp Cr co-blandina* $\times$ *sp sp cr co-blandina* repräsentieren die meisten Pflanzen den von der F_2 her bekannten breit cruciaten Typus, von dem nun kaum zu entscheiden ist, ob wir ihn als *Sp sp co co Cr_c cr* oder als *Sp sp co co cr_c cr* formulieren sollen. Wenn auch das *cr* der *sp sp cr cr co co-blandina* sich als verhältnismäßig schwach erweist, z. B. gegen *Cr* in *albicans* und *rubens* von *biennis* München ganz rezessiv ist, mag das mit der Anwesenheit des Großblütigkeitsfaktors *co* zusammenhängen. Eine tiefere Veränderung der chromosomischen Struktur liegt bei *sp cr-levans* nicht vor, denn der Mischling zwischen *sp cr-blandina* und dem Standardtypus zeigt in der Meiose 7 Paare (50/81, 51/107).

Auch stumpfblättrig normalkronige *blandina* kommt vor. In der Nachkommenschaft von *Sp sp*-Eltern möchte man die wenigen *sp sp Cr*-Pflanzen, die sich teilweise als *Cr cr* erweisen, als Crossovers ansprechen; da z. B. von *velans rubens* nie Stumpfkelche abgespalten werden, würde wohl Austausch von *cr*—*Cr*, nicht von *Sp*—*sp* vorliegen. Aber ebensogut kann mit Konversion gerechnet werden. Als Gegenstück zu *Sp cr_c* möchte man *sp Cr_c* erwarten, wo in 5 *Sp* 6 ein *Cr* von genügender Stärke vorhanden ist, und daß auch revertiertes *Cr* recht stark sein kann, ist wiederholt beobachtet. Am schwersten ist das Auftreten von *sp Cr* in der Nachkommenschaft von *sp sp cr cr co co-blandina* zu verstehen, wenn es wirklich vorkommt; es müßte Mutation von *cr* zu *Cr* unter der Wirkung des restlichen *co-levans*-Genoms sein, wie es bei der analogen *Hookeri*-Form fraglos geschieht. Langsames Abgleiten von *cr-blandina* in den *Cr*-Status im Lauf der Generationen ist sicher beobachtet.

Die *sp sp Cr-blandina* hat kleinere Blüten als die Standard-*blandina*; die Kronblätter messen etwa 36:40 gegen 45:50 mm. Wie die Kreuzungen der *cr sp-blandina* mit *blandina* Stand. zeigen, ist die durch *sp sp* hervorgerufene Kleinblütigkeit gegenüber der Großblütigkeit der *Sp Cr*-Form hypostatisch; die Kronblätter des Bastards sind genau so groß wie die der Standardform.

Die kleinblütige *blandina* aus cruciater *levorubata* ist noch entschiedener cruciat als die großblütige, und sie ist cruciat nicht nur als *sp sp* und als *Sp sp*, sondern auch in der *Sp Sp*-Form. Die schulmäßige Erklärung wäre, daß hier das *Sp*-Chromosom von *levans* das *cr* von *rubens* via Crossing-over aufgenommen hat. Aber im Hinblick auf den Gesamtbestand der Erfahrungen ist es durchaus möglich, daß mindestens teilweise Konversion vorliegt. Eingehender verfolgt ist die Frage nicht. Ausnahmsweise ist auch die kleinblütige *Sp-blandina* — ebenso wie die *levorubata* — normalkronig. Auf eine die Erhaltung des *cr*-Zustandes begünstigende Wirkung des von *biennis* stammenden *Co*-Allels, und eine den *cr*-Status gefährdende Wirkung des *co*-Allels sind wir auch bei der aus *cr-albilaeta* $\times$ *cr-albi-velutina* gewonnenen *Lamarckiana* gestoßen (R. 1957, S. 374). Sie ist sehr stabil cruciat wenn kleinblütig *Co Co*, sie ist auch noch gut cruciat wenn mittelgroßblütig *Co co*, und sie ist fast immer normalkronig (oft etwas defekt, selten cruciat) wenn großblütig *co co*. Die nach unserer Meinung maßgebenden Chromosomen, 5.6 von *gaudens* und 5.8 oder 6.7 von *velans*, liegen im 12er-Ring, und hier geht *cr*—*Cr* mit den ja immer dem Austausch unterliegenden *Co*-Faktoren. Aber bei

Sp Sp-blandina, die ihr *cr* ebenso wie *Lamarckiana* der Konversion, nicht der Aufnahme des *cr*-Chromosoms verdankt, ist es nicht anders: kleinblütig bleibt sie *cr*, großblütig fällt sie auf *Cr* zurück. Und wie *Sp co-levans* ein geschwächtes *Cr* besitzt, wenn es durch die Konversion zu *cr* hindurchgegangen ist, so ist das *Cr* von *co-gaudens* und *co-velans* nach der Reversion aus dem *cr*-Zustand als *Cr_r* schwächer als in der Ausgangsform. Daß an diesen Veränderungen der „Stärke“, d. h. der Konversionsaktivität (R. 1937, S. 106), Rekombinationen anderer Gene nicht beteiligt sind, *vermag ich nicht zu beweisen*. Aber nach Analogie mit anderen Fällen, in denen sämtliche Keimzellen eines Komplexes konvertiert erscheinen, wie bei *pictirubata*, halte ich für wahrscheinlich, daß die normale Rekombination durch Crossing-over, die sicher in bezug auf viele Gene vorkommt, keine wesentliche Rolle bei den anomalen Spaltungserscheinungen spielt.

Eine andere, durch die Erfahrungen an *Oe. Lamarckiana* nicht beeinflusste, wenigstens einem Teil der Befunde vielleicht noch besser gerecht werdende Auslegung ist die folgende. In den cruciaten Pflanzen der *levorubata* F₁ muß das *Cr* in 5 *Sp* 6 nicht bis zu *cr* konvertiert sein, sondern es ist bisweilen durch die Einwirkung von *cr* nur so weit verändert, daß es sich gegen das *cr* in 5 *sp* 6 rezessiv verhält. Dieses geschwächte *Cr_a* (attenuat) liegt dann auch in der breit cruciaten großblütigen *Sp sp-blandina* neben dem durch Rekombination gebildeten *cr sp-levans* vor, und die aus solcher *Sp sp-blandina* herausspaltende *Sp Sp*-Homozygote hat nie Defekte an den Kronblättern, weil ihr *levans* nur attenuates *Cr*, aber keine Elemente von *cr* besitzt. Rückmutation von *Cr_a* zum ursprünglichen Status, der *Cr_o* (original) heißen könnte, scheint vorzukommen.

Wird *sp cr co-blandina* mit einer normalkronigen *Lamarckiana* gekreuzt, die in ihren beiden Komplexen ein geschwächtes *Cr_r* besitzt, so fällt die *laetilevata* meist breit cruciat aus, und diese verhält sich wie die großblütige *Sp cr-blandina*. Die 5.6-Chromosomen werden ausgetauscht, und die *laetilevata* der F₂ zeigt die gleichen Gestalten wie die *blandina*: *sp sp* ist streng cruciat, *Sp sp* ist breit cruciat, *Sp Sp* ist normalkronig. — Die Verbindung von *sp Cr-levans* mit *Sp cr-gaudens* hat keinen Aufschluß über die Beziehungen zwischen *cr* und *sp* gebracht, wegen der Labilität der maßgebenden Allele.

Über die *levorubata* der Folgegenerationen ist nur zu sagen, daß bei ihr die gleichen Kombinationen der Gene *Sp*, *Cr*, *Co*, *R* und ihrer rezessiven Allele vorzukommen scheinen wie bei *blandina*; daß nicht alle wirklich beobachtet wurden, hängt wohl nur an der kleinen Zahl der *levans* · *rubens*-Individuen. Bei Verwendung von *biennis cruciata* fehlt ja *rubens* in den Embryosäcken ganz, und dazu sind augenscheinlich die *levans*-den *rubens*-Pollenschläuchen in der Konkurrenz überlegen. — Die aus *biennis* München × *blandina sp cr* großblütig entstandene Verbindung *sp Cr-rubens* · *sp cr-levans* war normalkronig, und auch ihre F₂ war fast durchaus *Cr*, wohl infolge der Konversion des schwachen *cr* in *sp-levans* durch das starke *Cr* in *rubens*.

Die *albivervata* ist der *albivelutina* ähnlich, wie in der Tracht und in der chromosomischen Struktur, so auch im Verhalten. *P*-Crossovers als *P-albicans* · *levans* kommen vor, auch anscheinend trisomische *albata*-Individuen waren nicht selten.

Konversion zwischen *albicans* und *levans* ist beobachtet in der Kombination *Cr-albicans* · *cr-sp-levans*. Aus der normalkronigen Verbindung *cr-albicans* · *Cr-levans* spaltete keine *cr-blandina* heraus, was nicht eindeutig ist.

Gelbscheckung des Laubs, wie sie in der F_1 der (*biennis* × *Lamarckiana*) *albivelutina* häufig auftritt (vgl. R. 1957, S. 367), findet sich bei (*biennis* × *blandina*) *albivata* nicht. Da die Plastiden der *Lamarckiana* mit denen ihrer Mutante *blandina* identisch zu sein scheinen, liegt der Unterschied zwischen *albivelutina* und *albivata* wohl an der *genischen* Differenz zwischen *velans* und *levans*.

Zusammenfassung der wesentlichsten Ergebnisse

Der Mischling *Oe. (biennis cruciata* × *blandina*) *levorubata* ist in F_1 teilweise cruciat; in solchen Individuen ist das *Cr* von *levans* durch *cr-rubens* geschwächt oder gar zu *cr_c* konvertiert. In der F_2 aus Selbstbestäubung variieren die *blandina*, ebenso wie die weniger zahlreich auftretenden *levorubata*, nach $R-r$ (weil 1.2 doppelt vorhanden), nach $Sp-sp$ (weil 5.6 doppelt vorhanden), nach $Co-co$ (durch häufiges Crossing-over im 10er-Ring). Die *sp-sp-blandina* sind fast immer cruciat, gleichgültig ob klein oder großblütig; *Sp-sp-blandina* ist breit cruciat bis intermediär, selten normalkronig wenn großblütig, schmaler cruciat wenn kleinblütig; *Sp Sp-blandina* ist normalkronig wenn großblütig, mit kleinen Blüten kann sie cruciat sein.

Die als wahrscheinlich erachtete Deutung ist folgende. Der Locus *cr* gehört dem 5.6-Chromosom von *rubens* an, das auch *sp* enthält, *Cr* mit *Sp* liegt in 5.6 von *levans*. *Blandina* kann deshalb stabil cruciat werden, wenn ihr *levans* sich das ganze 5.6-Chromosom von *rubens* einverleibt hat, bei kleiner wie bei großer Blüte. Wie in anderen Komplexverbindungen kann aber *Cr* im *Sp*-Chromosom von *levans* auch durch Konversion zu *cr*, und zwar zu *cr_c* werden, wenn *cr-rubens* zugegen ist; das geschieht vor allem in der F_1 der *levorubata*. Der konvertierte Zustand erhält sich, wenn *Sp cr_c-levans* mit *sp cr-levans* verbunden ist, gleichgültig ob daneben *Co Co* oder *co co* vorhanden ist; er erhält sich auch, als *cr_c cr_c*, in *Sp Sp Co Co*; aber er mutiert gewöhnlich zu *Cr* zurück, er wird zu *Cr_r Cr_r*, in *Sp Sp co co-blandina*. Das steht in Analogie zu dem Verhalten der *cr_c cr_c-Lamarckiana*, die sich in cruciatem Zustand hält wenn klein- oder mittelblütig, aber fast immer auf *Cr_r Cr_r* zurückfällt bei großer Blüte. Der revertierte *Cr*-Status ist gegen genuines *cr* schwächer als das genuine *Cr*, bei *blandina* wie bei *Lamarckiana*. Mindestens ein Teil der Erscheinungen ist am ehesten zu deuten durch die Annahme, daß das *Cr* von *levans*, statt zu *cr* konvertiert zu werden, nur bis zu rezessivem Verhalten heruntergedrückt wird, daß *Cr* in *Cr_a* (attenuat) abgeändert wird. Im Phänotypus der *Cr_aCr_a-blandina* käme diese Veränderung nicht einmal in leichten Defekten der Petala zum Ausdruck.

Die großblütig cruciate *sp sp-blandina* neigt dazu, in kleinen Schritten in die Normalkronigkeit überzugehen; ob die kleinblütige *sp sp*-Form noch stabiler ist, wurde nicht lange genug geprüft. Vielleicht kommt in der *sp sp cr cr co co-blandina* auch sprunghafte Mutation zu dezidiertem *Cr* vor; ob in *Sp sp Cr cr co co*-Pflanzen die Kombination *sp Cr-levans* außer durch Konversion auch durch Crossing-over, und zwar durch Austausch von *cr-Cr* entsteht, ist ungewiß.

Die *albivata* aus *Oe. biennis* $\times$ *blandina* verhält sich ähnlich wie (*biennis* $\times$ *Lamarckiana*) *albivelutina*; Konversion von *Cr* in *cr* und vice versa kommt in *Cr-albicans* $\cdot$ *cr sp-levans* vor.

Literatur

HARTE, C.: Dominanzwechsel bei *Oenothera* als genetisches und entwicklungsphysiologisches Problem. Z. Vererbungslehre **83**, 318—323 (1950). — RENNER, O.: Über *Oenothera atrovirens* Sh. et Bartl. und über somatische Konversion im Erbgang des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. Z. Vererbungslehre **75**, 91—124 (1937). — Beiträge zur Kenntnis des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. IV. Gigas-Bastarde. Labilität und Konversibilität der *Cr*-Gene. Z. Vererbungslehre **80**, 590—611 (1942). — Über die Entstehung homozygotischer Formen aus komplexheterozygotischen *Oenotheren*. II. Die Translokationshomozygoten. Z. Bot. **39**, 49—105 (1943). — Über den Erbgang des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. V. *Planta* (Berl.) **48**, 343—392 (1957). — VII. Mitt. Verbindungen der *Oenothera Hookeri*, *franciscana* und *purpurata*. (Im Druck.)

Professor Dr. O. RENNER, Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Str. 67

Aus dem Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität
Berlin-Dahlem

KERNGESTEUERTE GYNODIÖZIE BEI *SALVIA NEMOROSA*

Von

GERTRUD LINNERT

(Eingegangen am 7. Oktober 1957)

A. Einleitung

So vielfältig die Mechanismen der Geschlechtsvererbung sind, so einförmig schien bisher die Vererbung der Gynodiözie geregelt zu sein. Während die Diözie durch einzelne oder mehrere zusammenwirkende Gene, auf Geschlechtschromosomen gekoppelt oder frei spaltend, mit oder ohne Mitwirkung des Plasmas gesteuert wird, waren bis vor kurzem nur solche Fälle von Gynodiözie bekannt, die auf rein plasmatischer Basis vererbt werden. Es ist jedoch keinesfalls anzunehmen, daß die Vererbung von Diözie und die von Gynodiözie grundlegend voneinander verschieden seien, denn die für die Diözie verantwortlichen bekannten Faktoren erlauben ohne weiteres auch den Aufbau von Systemen, in denen nur Weibchen und Zwitter auftreten. Um so merkwürdiger war es, daß in der Gynodiözie allein die plasmatischen Faktoren wirksam sein sollten.

Die bekannten Fälle von Gynodiözie, *Satureja*, *Cirsium*, *Aquilegia* usw. zeichnen sich dadurch aus, daß die Weibchen immer nur Weibchen hervorbringen, während die Nachkommen der Zwitter stets zwittrig sind. Da die Weibchen nur von Zwittern befruchtet werden können, werden ständig Zwittergenome in die Nachkommen der Weibchen eingeführt. Trotz dieses ständigen Rückkreuzungsmechanismus, der in längeren Zeiträumen notwendigerweise zur Identität der Kerne von Weibchen und Zwittern führen muß, bleiben alle Nachkommenschaften aller Weibchen weiblich. Auch die Versuche, durch Artkreuzungen Genome aus rein zwittrigen Arten in die Weibchen einzuführen (CORRENS 1916 mit *Cirsium*, KAPPERT, 1943 mit *Aquilegia*), änderten nichts an der Geschlechtsausprägung der Nachkommen, ebensowenig wie das Einkreuzen von Genomen einer pollenfertilen Rasse von *Zea Mays* mit markierten Chromosomen in eine pollensterile Rasse (RHOADES 1931, 1933). Damit war eindeutig bewiesen, daß bei diesen Arten ausschließlich das Plasma für die Vererbung von Weiblichkeit und Zwitterigkeit verantwortlich ist.

Kerngesteuerte Gynodiözie wurde zuerst durch die Untersuchungen von LEWIS und CROWE (1956) bekannt. Bei *Origanum vulgare* gibt es Weibchen und Zwitter, jedoch können hier beide Formen wiederum Weibchen und Zwitter abspalten. Die Autoren erklären ihre Befunde mit der Annahme eines dominanten Genes für Weiblichkeit F und eines darüber epistatischen dominanten Hemmungsfaktors H. Da bestimmte Genotypen in der daraus resultierenden sehr komplexen Population letal bzw. selbststeril sind, bleibt das Verhältnis von Weibchen und Zwittern in den aufeinanderfolgenden Generationen konstant, das System ist ausgewogen.

Bei *Salvia nemorosa* fand sich ebenfalls eine Form der Gynodiözie, die nicht plasmatisch gesteuert sein kann. Im Gegensatz zu *Origanum* jedoch spalten hier die Zwitter nie, sie geben stets nur Zwitter. Unter den Nachkommenschaften der Weibchen finden sich dagegen nach kontrollierter Bestäubung solche, die in Weibchen und Zwitter spalten, aber auch rein weibliche. Somit scheint hier etwas Neues vorzuliegen. Die Befunde lassen sich weder mit Hilfe der Plasmatheorie erklären noch mit der Hypothese, die auf *Origanum* paßt. Besonders interessant ist daran, daß bestimmte Pflanzen oder Linien, für sich allein betrachtet, dem *Satureja*-Modell entsprechen. Aus diesen Gründen schien es aufschlußreich, zu untersuchen, wie der Vererbungsmechanismus in diesem Fall beschaffen ist, und ob sich daraus neue Gesichtspunkte für die Interpretation des *Satureja*-Falles ergeben. Diese Fragen sollen deshalb im folgenden untersucht und diskutiert werden.

B. Material und Methode

Aus dem Botanischen Garten München war 1952 Saatgut verschiedener *Salvia*-Arten bezogen worden. Darunter waren 2 Proben mit den Bezeichnungen *S. przewalskii* und *S. nemorosa*, die einander völlig glichen. In beiden Proben waren die meisten Pflanzen männlich steril, nur 3 Zwitter fanden sich unter den insgesamt 16 Pflanzen der 1. Generation. Hinfort wurden die beiden Populationen zusammengekommen. Eine weitere Ausgangspflanze (N) stammt aus dem Botanischen Garten Freiburg, ebenfalls unter dem Namen *S. nemorosa*. Sie war zwittrig mit pollensterilen Endblüten. Die genaue Bestimmung der Art, die auch als Zierpflanze im Handel ist, war bis jetzt nicht möglich. Sie stimmt morphologisch und zytologisch mit der Beschreibung überein, die HRUBY (1935) für *S. nemorosa* gab, deshalb sei vorläufig dieser Name beibehalten.

In den Jahren 1952—1955 wurden, stets nach Einzelpflanzen getrennte und kontrollierte, Kreuzungen und Selbstungen der Zwitter und Kreuzungen verschiedener Weibchen mit bestimmten Vätern durchgeführt. Sämtliche Generationen wurden im Freiland kultiviert und die Infloreszenzen mit Pergaminbeuteln isoliert.

Die Kreuzungs- und Selbstungsarbeiten sind außerordentlich erschwert, 1. durch eine große Empfindlichkeit der Knospen und Blüten, die oft schon bei ganz vorsichtiger Berührung abfallen, 2. durch die kleine Zahl von Samen in einer Labiatenblüte, 3. durch schlechten Samenansatz und 4. durch einen hohen Prozentsatz tauber Samen. Deshalb waren oft die Nachkommenschaften sehr klein. Naturgemäß kamen vor allem solche Pflanzen zur Weiterzucht, die den besten Ansatz hatten. Dadurch wurde unwillkürlich Selektion getrieben, und diese zeigte auch in wenigen Jahren schon deutliche Erfolge: der Ansatz und die Ausbeute an keimfähigen Samen wurde von Jahr zu Jahr besser. Da die Pflanzen ausdauernd sind, ist es möglich, die Pflanzen früherer Generationen wieder zum Kreuzen heranzuziehen.

Bei *Salvia nemorosa* sind die weiblichen Pflanzen in allen Blüten rein weiblich, die Antheren sind bis auf ein winziges weißes Rudiment reduziert. Die Zwitter dagegen haben von der ersten bis zur letzten Blüte normale große Antheren, die reichlich Pollen produzieren. Das steht im Gegensatz zu den Beobachtungen CORRENS' an *Satureja*, wo die ersten und die letzten Blüten der Zwitter öfter ebenfalls weiblich sind. Im Laufe der Versuche spalteten außer den reinen Zwittern auch solche mit eingeschränkter Pollenfertilität heraus. Diese äußert sich in einer Verkürzung der Filamente der fertilen Antheren und in einer von Blüte zu Blüte verschiedenen, mehr oder weniger starken Reduktion der Antheren. Zuweilen sind die Antheren zwar groß und gelb, aber sie öffnen sich nicht; zuweilen sind sie kleiner als die normalen Antheren oder sogar in gleicher Weise reduziert wie bei den Weibchen. Immer aber finden sich an diesen Pflanzen auch Blüten mit normal fertilen Antheren. Gegen Ende der Blütezeit ist die Reduktion

der Antheren am stärksten ausgeprägt. Zwei Pflanzen hatten scheinbar normale Antheren, aber diese öffneten sich nicht und die Pflanzen produzierten keinerlei Pollen. Sie waren also eigentlich weiblich, müssen aber von den richtigen Weibchen unterschieden werden, denn es handelt sich um eine ganz andere Art von Pollensterilität.

Außer den beiden unterschiedlichen Formen männlicher Sterilität wurden auch noch andere Charaktere in die Untersuchungen einbezogen, die aus dem Material herauspalteten. Da war zunächst ein Tupfungsfaktor: die normalen Pflanzen haben durch Anthozyan rotgefärbte Haarbasen. In manchen Nachkommenschaften spalteten rein grüne Formen ohne Anthozyan heraus. Außerdem trat schon im ersten Jahr eine weißblühende Pflanze auf, die jedoch sehr schlechte Pollen hatte und unter der Tüte keinen Ansatz brachte. In frei abgeblühtem Saatgut traten wieder weiße auf. Dieser Faktor wurde aber nicht weiter untersucht. Weiterhin trat eine Spaltung auf, bei der ein Teil der Individuen Deformationen der ganzen Pflanze zeigte. Die Rosettenblätter dieses Typs sind schmal, zungenförmig, oft ist die Mittelrippe verkürzt, so daß sich das Blatt tütenförmig einstülpt. Zuweilen sind die Blätter aber auch auffallend spitz. In manchen Linien sind die Seitenzweige letzter Ordnung mehrere Zentimeter weit mit der Hauptachse verwachsen. Die Zahl der Blüten in einem Wirtel — normalerweise sind es sechs — ist unregelmäßig reduziert, so daß die Infloreszenzen schartig wirken. Immer ist die Oberlippe verkürzt, so daß die Antheren daraus hervorragen. Die Antheren sind zuweilen teilweise verkümmert und die Zahl der Klausenfrüchte ist manchmal auf 3 oder 2 reduziert. Der ganze Merkmalskomplex ist also sehr variabel und die Pflanzen sehen in jeder Nummer etwas anders aus: manchmal fehlt die eine oder andere Abnormität ganz, oft zeigen sie sich nur an einem Ast. In allen Fällen aber tritt die Reduktion der Oberlippe deutlich auf.

C. Experimenteller Teil

I. Die Keimfähigkeit der Samen

Bei einem Teil der Aufzuchten von 1955 wurde eine Keimprüfung durchgeführt, um Anhaltspunkte über das Ausmaß der Letalität zu gewinnen. Der Samensatz selbst wurde nicht getestet, denn Ausfälle hierin mögen durch die Bestäubungsbedingungen, das Eintüten, die Güte und das Alter des verwendeten Pollens und die Witterungsbedingungen verursacht sein.

Unter den gewonnenen Samen, die zu einiger Größe herangewachsen waren, befand sich stets ein Teil leerer tauber Schalen. Ein anderer Teil enthielt zwar einen Embryo, aber die Samen keimten dennoch nicht oder die Keimlinge starben vor dem Pikieren ab. Zuweilen mag Pilzbefall die Ursache davon sein, so daß das Absterben der Embryonen nicht die Folge einer echten Letalität zu sein braucht. Die Erfahrung hat jedoch gelehrt, daß gerade die schwach wüchsigen Keimlinge besonders oft von Pilzen befallen werden.

Die Ergebnisse des Keimtestes sind in Tabelle 1 zusammengestellt, jeweils die absoluten Zahlen und die Prozentsätze untereinander. In den Selbstungsnachkommenschaften ist der Anteil tauber Samen am größten: er schwankt durchweg zwischen 39% und 60%. In den Kreuzungsnachkommen der Weibchen fällt die Nr. 118 mit 63,9% tauben Samen auf, auch in der Nr. 115 ist deren Anteil mit 38,7% recht groß. In den anderen Nummern dagegen ist die Zahl der tauben Samen bedeutend niedriger, sie schwankt zwischen 2,9% und 21%. Die embryohaltigen nichtkeimenden Samen sind in Selbstungen wie in Kreuzungen ziemlich zahlreich. Ihr Anteil schwankt zwischen 7,4% und 56,8%. Eine Korrelation zwischen der Taubheit und der Keimunfähigkeit der Samen besteht offenbar nicht.

Die Keimungsprozentsätze, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgelegten Samen, sind auffallend niedrig. Nur die Nr. 90 kann als normal bezeichnet werden, alle anderen zeigen einen beträchtlichen Grad von Samensterilität. Hierbei zeigt sich auch deutlich, daß davon die Selbstungen bedeutend stärker betroffen sind als die Kreuzungen. Während unter der Summe aller zufällig herausgegriffenen Nachkommenschaften, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind, die

Kreuzungen noch 55,5% keimender Samen aufweisen, ist der Gesamtanteil in den Selbstungen nur 29,7%. Vermutlich sind in der Population eine Reihe von Letal- und Subletalfaktoren enthalten, deren Wirkung sich in den Selbstungen am deutlichsten zeigt. Aber auch in den Kreuzungsnachkommenschaften zeigen manche Kombinationen einen hohen Grad von Sterilität.

Tabelle 1. Die Keimfähigkeit der Samen

Aufzucht Nr.		Ins- gesamt aus- gelegt	Taub	Mit Em- bryo- unge- keimt	Pikiert	Über- lebende %
90	♀ × ♂ in %	68	2 2,9	5 7,4	61	89,7
104	♀ × ♂ in %	97	3 3,1	25 25,8	69	71,1
106	♀ × ♂ in %	9	2 22,2	0 0	7	77,8
107	♀ × ♂ in %	51	1 2,0	29 56,8	21	41,2
111	♀ × ♂ in %	149	31 20,8	45 30,2	73	49,0
112	♀ × ♂ in %	10	0 0	9 90	1	10,0
113	♀ × ♂ in %	30	4 13,3	4 13,3	22	73,4
115	♀ × ♂ in %	31	12 38,7	14 45,2	5	16,1
116	♀ × ♂ in %	39	5 12,8	17 43,6	17	43,6
118	♀ × ♂ in %	83	53 63,9	21 25,3	9	10,8
120	♂ × ♂ in %	100	15 15	11 11	74	74
121	♀ × ♂ in %	48	3 6,2	7 14,6	38	79,2
125	♀ selbst in %	99	49 49,5	20 20,2	30	30,3
126	♂ selbst in %	137	54 39,4	52 38,0	31	22,6
128	♂ selbst in %	25	15 60,0	6 24,0	4	16,0
132	♂ selbst in %	86	36 41,8	12 14,0	38	44,2

II. Der Anteil pollensteriler Pflanzen in den Kreuzungen zwischen Weibchen und Zwittern und in den Selbstungen der Zwitter

Im Jahre 1952 wurde eine Reihe von Weibchen mit dem Pollen der Zwitterpflanze P 4 belegt und diese geselbstet. Von diesen unter Kontrolle bestäubten Pflanzen brachte nur die Kreuzung P 2 ♀ × P 4 ♂ 20 Nachkommen, die alle weiblich waren. Die anderen Kombinationen brachten nur taube Samen, die wenigen überlebenden Keimlinge gingen in der Keimchale ein. Deshalb wurden auch die Samen frei abgeblühter Infloreszenzen geerntet und diese aufgezogen. In diesen Nachkommenschaften fanden sich Weibchen und Zwitter in verschiedener Häufigkeit, wie aus der ersten Abteilung der Tabelle 3 und aus Tabelle 2 zu ersehen ist. Die Zwitterpflanze P4 hatte

nur zwittrige Nachkommen, die Nachkommen der weiblichen Pflanze P 2 waren alle weiblich. Aus den Samen der Pflanze P 5 gingen 10 Weibchen und 2 Zwitter hervor, das Weibchen P 10 brachte 3 Weibchen und 2 Zwitter, also sogar annähernd gleiche Anteile. Wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten und der hochgradigen Sterilität waren die Nachkommenschaften sehr klein, so daß es nötig, aber auch aussichtsreich erschien, die Versuche weiterzuführen.

So wurden also wiederum einzelne Weibchen mit bestimmten Vätern gekreuzt und einzelne Väter zur Selbstbestäubung gezwungen. Die Nachkommen der Pflanze P 2 werden nun mit 2/1, 2/2 usw. bezeichnet, die der Pflanze P 4 mit 4/1, 4/2 usw. Aus den Tabellen 2 und 3 geht hervor, daß die Zwitter lauter zwittrige Nachkommen hervorbrachten, von denen einige allerdings teilweise pollensteril waren. Ihre Fertilität war auch im 2. Jahr äußerst gering, es kamen im Höchstfall 9 Pflanzen zur Blüte, oft waren es nur 2 oder 3. Die Nachkommenschaften der Weibchen waren mehrmals rein weiblich (Nr. 31 und 36), aber meistens gab es eine Aufspaltung in Weibchen und Zwitter, in verschiedenen

Tabelle 2. *Die Selbstbestäubungen der Zwitter*

Jahr der Aufzucht	Nr.	Elter	n	♀	♂
1953	2	P 4	20	0	20
1954	37	4/1	9	0	9
	38	4/2	9	0	9
	39	4/3	4	0	4
	40	4/4	3	(1) ¹	2
	43	10/2	5	0	5
	50	N/1	1	0	1
					(3 nichtblühende)
1955	125	32/11	69	0	69
	126	32/14	22	0	22
	127	32/41	43	0	43
	128	33/11	35	0	35
	129	33/1	11	0	11
	130	33/18	6	0	6
	131	33/32	16	0	16
	132	34/5	68	0	68
	133	34/8	15	0	15
	134	34/13	43	0	43
	135	34/21	1	0	1
	136	34/24	42	0	42
	137	34/31	37	0	37

¹ War vermutlich nur partiell pollensteril.

zu testen, also ein Weibchen mit mehreren Zwittern zu kreuzen und jeden Zwitter mehrmals als Vater auf verschiedenen Weibchen zu prüfen. Daneben wurden auch die Zwitter nach Möglichkeit geselbstet. Die Ergebnisse der Aufzuchten von 1955 sind im letzten Abschnitt der Tabelle 3 zusammengestellt, die Zwitternachkommenschaften sind in Tabelle 2 mit aufgeführt. Wieder traten zwei rein weibliche Nachkommenschaften auf, in den Kreuzungen Nr. 87 und 89. In beiden Fällen war als Vater die Pflanze 4/4 verwendet worden. Alle anderen Kreuzungen aber brachten eine Spaltung in Weibchen und Zwitter. Die Nachkommen der Zwitter waren alle zwittrig. Ein Teil der Zwitter war partiell pollensteril, und zwar unter den Nachkommen der Weibchen ebenso wie unter denen der Zwitter. Die Besprechung dieser Ergebnisse soll im anschließenden Abschnitt folgen.

III. Diskussion der Ergebnisse

a) **Die Nachkommen der Weibchen.** Unter den Nachkommen der Weibchen treten rein weibliche und normal zwittrige Pflanzen auf, während die Zwitter

Zahlenverhältnissen, die manchmal ein 3:1-, manchmal ein 1:1-Verhältnis zu representieren scheinen. Die Nachkommenschaften der Weibchen waren zwar etwas größer als die der Zwitter; da sie aber auch im günstigsten Fall nicht mehr als 58 Individuen enthielten, wurden die Versuche noch ein weiteres Jahr fortgesetzt. Im Sommer 1954 wurden deshalb nochmals in großem Umfange Kreuzungen zwischen Weibchen und Zwittern durchgeführt, wobei das Bestreben war, 1. die Nachkommenschaften so groß wie möglich zu machen und 2. ein und dieselbe Pflanze möglichst in mehreren Kombinationen

nur zwittrige Nachkommen bringen. Auch die Zwitterpflanzen, die von einer weiblichen Pflanze abstammen, verhalten sich so. Eine Differenz im Plasmon kann demnach nicht für das Geschlechtsverhalten verantwortlich sein, denn Zwitter und Weibchen können dieselben Mütter haben. Die Unterschiede müssen also durch den Kern übertragen werden.

Es erhebt sich hier die Frage, warum in manchen Nachkommenschaften nur Weibchen auftreten, und warum das Spaltungsverhältnis manchmal wie 1:1, manchmal wie 3:1 oder wie 5:3 zu sein scheint. Am häufigsten ist ein Verhältnis von Weibchen und Zwittern wie 1:1. Das ist am leichtesten zu verstehen, denn es ist ein Rückkreuzungsverhältnis, wie man es bei Homozygotie des einen und Heterozygotie des anderen Partners erwarten muß. Demnach ist also ein dominantes Gen (F) für die Weiblichkeit verantwortlich, dessen rezessive Form ff Zwitterigkeit bedingt. Die Weibchen sind Ff, die Zwitter ff, Selbstung der Zwitter gibt wieder Zwitter, Weibchen $\times$ Zwitter gibt Weibchen und Zwitter, zu gleichen Teilen. Zusätzlich zu dem Faktorenpaar Ff müssen aber noch andere Kerngene wirken, die das Geschlechtsverhältnis modifizieren.

Angenommen z. B., es käme noch ein rezessiver Faktor m für Weiblichkeit dazu, F wäre epistatisch über M, aber ffmm-Pflanzen wären weiblich, dann wären die Spaltungsverhältnisse 1:1, 3:1 und 5:3 zu erwarten.

Die Kombination:

FfMm $\times$ ffMm	gäbe 5 Weibchen : 3 Zwitter
Ffmm $\times$ ffMm	gäbe 3 Weibchen : 1 Zwitter
FfMM $\times$ ff . .	gäbe 1 Weibchen : 1 Zwitter
Ff . . $\times$ ffMM	gäbe 1 Weibchen : 1 Zwitter
ffmm $\times$ ffMm	gäbe 1 Weibchen : 1 Zwitter
ffmm $\times$ ffMM	gäbe ∞ Zwitter

Unter dieser Voraussetzung müßten also die ffmm-Weibchen mit einem ffMM-Zwitter zusammen lauter Zwitter bringen, rein weibliche Nachkommenschaften wären dagegen nicht zu erwarten. Außerdem müßten dann auch manche Zwitter Weibchen abspalten, nämlich die ffMm-Formen. Alles das trifft nicht zu, weder wurden jemals spaltende Zwitter noch nur Zwitter produzierende Weibchen gefunden. *Diese Hypothese ist also zu verwerfen.*

Aus demselben Grund kann auch die Erklärung, die LEWIS und CROWE für das Verhalten von *Origanum* gaben, nicht auf *Salvia* angewandt werden. Bei *Origanum* spalten beide Formen, Weibchen und Zwitter. Da die Wirkung des Faktors F durch den epistatischen Hemmungsfaktor H aufgehoben wird, können also Zwitter mit einem oder sogar zwei Weiblichkeitsfaktoren existieren, wenn sie den Hemmungsfaktor enthalten. Die Zwitter FFHh oder FfHh spalten also. *Bei Salvia aber spalten die Zwitter nie.*

Selbststerilität kommt deshalb als Ursache für das Ausfallen der Zwitter nicht in Frage, weil in den betreffenden Kombinationen nicht die Befruchtung überhaupt verhindert ist; Weibchen entstehen dabei. Da der Pollen in bezug auf den Faktor f homozygotisch sein muß, kann nur entweder die Entwicklung der f-Eizellen oder der ff-Homozygoten gehemmt sein. Auch das Vorhandensein eines Eizellenletalfaktors ist indessen auszuschließen, denn unter den Töchtern aus den rein weiblichen Nachkommenschaften Nr. 1 und 31 fanden sich sowohl spaltende als auch nichtspaltende, letztere immer bei Verwendung desselben Vaters.

So bleibt als einzige Erklärungsmöglichkeit die, daß das auf Grund der Aktion von F und f zu erwartende Spaltungsverhältnis von 1:1 durch zygotische Letal- oder Subletal-faktoren gestört wird. Damit wäre zu erklären, daß die Nachkommenschaften der Zwitter meistens besonders klein sind und daß in den Spaltungen

der Weibchen oft zu wenig Zwitter auftreten. Der hohe Anteil tauber Samen weist daraufhin, daß Letalfaktoren, und zwar mehrere, vorhanden sind. Einer davon mag mit dem Allel f gekoppelt sein, so daß die f let/ f let-Individuen ausfallen und nur die Weibchen überleben. So lassen sich die rein weiblichen Nachkommenschaften erklären. In den betreffenden Kombinationen müßten dann die Mütter die Konstitution $F+/f$ let besitzen, die Väter f let/ f let sein. Die Schwierigkeit bei dieser Annahme ist die, daß die Väter theoretisch überhaupt nicht existieren dürften. Es wäre aber denkbar, daß gelegentlich eine f let/ f let-Pflanze ausnahmsweise überlebt, vielleicht in einem bestimmten genetischen Milieu, und dann normal weiterwächst. Diese Pflanzen müßten in der Selbstung weitgehend steril sein, mit $F+$ oder $f+$ -Eizellen zusammen jedoch normal funktionieren. Unsere Versuchsergebnisse widersprechen dieser Annahme keineswegs. Die Väter der rein weiblichen Nachkommenschaften waren 1mal die Pflanze P 4, 3mal ihr Abkömmling 4/4 und 1mal die Pflanze N. Der Vater 4/4 war also mehrmals beteiligt; alle Väter erfüllten offenbar die obengenannte Bedingung, den Letalfaktor homozygotisch zu enthalten. Tatsächlich waren sie bei Selbstbestäubung alle weitgehend steril. Pflanze P 4 brachte überhaupt keine Selbstungsnachkommen, nur durch frei abgeblühtes Saatgut konnte die Linie erhalten werden. Als Vater mit P 2 gab sie lauter Weibchen. Diese Töchter, sowie auch die Mutter P 2, mußten die Konstitution $F+/f$ let besessen haben. Unter den frei abgeblühten Samen von P 4 waren wieder einige ausnahmsweise lebensfähige Pflanzen, sowie durch Fremdbestäubung entstandene Heterozygoten $f+/f$ let. Die Pflanzen 4/1 und 4/2 waren vermutlich $f+/f$ let, sie hatten nach Selbstbestäubung 11 bzw. 9 Nachkommen, mit Weibchen gekreuzt brachte 4/2 46 Weibchen und 12 Zwitter. 4/4 dagegen war offenbar eine Ausnahmepflanze f let/ f let wie der Vater. Nach Selbstbestäubung brachte sie nur 3 Nachkommen, von denen einer weiß und teilweise pollensteril war. Wurde sie als Vater mit den $F+/f$ let-Weibchen aus der obengenannten Kreuzung Nr. 1 verwendet, dann entstanden in einem Fall 20 Weibchen, im andern gab es auf 56 Weibchen einen Zwitter. Dieser ist vermutlich wieder eine Ausnahmepflanze gewesen. Auch die Pflanze N hatte in der Kreuzung Nr. 36 nur weibliche Nachkommen, nach Selbstbestäubung brachte sie 4 Nachkommen, von denen aber nur einer zur Blüte kam. Auch diese Pflanze scheint demnach f let/ f let gewesen zu sein. Die Pflanzen P 5 und P 10 sowie die beiden nicht weiterverwendeten Zwitter enthielten offenbar das Normalgen $f+$, so daß in allen anderen Nachkommenschaften Zwitter neben den Weibchen auftraten.

Wenn also P 2 vom Genotyp $F+/f$ let war und P 4 f let/ f let, dann müssen auch alle zur Weiterzucht verwendeten Weibchen aus der Kreuzung Nr. 1 $F+/f$ let gewesen sein. Wenn die Pflanze 4/2 den Genotyp $f+/f$ let hatte, dann müssen in Nr. 32 zweierlei Weibchen auftreten: $F+/f$ let und $F+/f+$. Die Zwitter aus derselben Kreuzung müssen alle $f+/f$ let sein. Wenn die Pflanze P 10 $F+/f+$ gewesen ist, können ihre Zwitternachkommen aus freier Bestäubung entweder $f+/f+$ oder $f+/f$ let gewesen sein. Beide müßten mit den $F+/f+$ -Weibchen eine 1:1-Spaltung ergeben, die letzteren mit $f+/f$ let-Weibchen zusammen eine Spaltung in 2 Weibchen:1 Zwitter bringen. Die $f+/f+$ -Zwitter sollten mit allen Weibchen stets Weibchen und Zwitter zu gleichen Teilen bringen. Also wäre zu erwarten: aus Nr. 31 ♀ $\times$ 32 ♂ stets ein 2:1-Verhältnis, in den Kreuzungen

32 ♀ × 32 ♂ sollten die Hälfte der Kreuzungen wie 1:1, die Hälfte wie 2:1 spalten. Die Zwitter aus den Nr. 33 und 34 können mit denselben Weibchen, die vorher 2:1 spalteten, eine 1:1-Spaltung ergeben, wenn sie f+/f+ sind. Betrachtet man die gefundenen Zahlenverhältnisse unter diesem Aspekt, so findet man eine gewisse Übereinstimmung mit der Erwartung. Es treten 1:1-Verhältnisse auf und solche, bei denen bedeutend mehr Weibchen als Zwitter gebildet wurden, in den Kombinationen, in denen sie erwartet werden. Allerdings ist das Zahlenverhältnis von 2 ♀♀:1 ♂ niemals exakt realisiert, vielmehr finden sich öfter Zahlen, die ziemlich gut einem 5:3-Verhältnis entsprechen. Auf Grund mechanischer Spaltung ist ein solches Verhältnis mit der dargestellten Hypothese nicht zu erklären. Das Auftreten von mehr als $\frac{1}{3}$ Zwittern ist höchstens durch Gonenkonkurrenz zu verstehen, wenn man annimmt, daß die f+-Pollenschläuche gegenüber dem flet-Pollen ein wenig im Vorteil sind. Da der Wettbewerb in jeder Blüte nur um vier zu befruchtende Samenanlagen geht, würde eine kleine Differenz in der physiologischen Leistungsfähigkeit der beiden Pollensorten schon einen merklichen Effekt geben. Es wäre denkbar, daß dadurch eine zu erwartende 2:1-Spaltung in ein 5:3-Verhältnis oder ein anderes umgewandelt wird.

Kleinere Abweichungen vom 1:1-Verhältnis zugunsten der Weibchen können dadurch entstehen, daß entweder die F-Eizellen die f-Eizellen verdrängen, oder sie können auf Bonitierungsfehler zurückzuführen sein. Es ist möglich, daß zuweilen ein stark abgeblühter partiell-pollensteriler Zwitter irrtümlich als Weibchen gezählt wurde. Dadurch könnte ein zu erwartendes 1:1-Verhältnis manchmal ein wenig gestört worden sein. Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeiten stehen die Befunde in keinerlei Widerspruch mit der oben dargestellten Hypothese.

b) Die Nachkommen der Zwitter. Die Nachkommenschaften der Zwitter sind stets und ausschließlich ebenfalls zwittrig, niemals fand sich darunter eine weibliche Pflanze. Wie oben auseinandergesetzt wurde, müssen wir ihnen die

Tabelle 4. Die Spaltungen des Faktors für partielle Pollensterilität

Lfd. Nr.	Elter	normal	partiell steril		Lfd. Nr.	Elter	normal	partiell steril	
125	32/11	54	: 15		128	33/11	31	: 4	
126	32/14	14	: 5		129	33/1	11	: 0	
127	32/41	32	: 11		131	33/32	15	: 1	
134	34/13	36	: 7		136	34/24	39	: 3	
Sa		136	: 38		Sa		96	: 8	
erw. (3:1)		130,5	43,5	P = 0,3	erw. (15:1)		97,5	6,5	P = 0,5

Konstitution ff zuschreiben. An ihnen manifestiert sich nun aber ein Pollensterilitätsfaktor, der sich in seiner Wirkung deutlich von dem oben beschriebenen Weiblichkeitsfaktor unterscheidet. Seine besonderen Kennzeichen wurden im Abschnitt B beschrieben. Die Spaltungsverhältnisse dieses Merkmals waren unterschiedlich: (Tabelle 4). Einige Male entsprechen sie sehr gut einem 3:1-Verhältnis. In den Nr. 125, 126, 127 und 134 ist die Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung einer 3:1-Spaltung gut. In einigen anderen Nachkommenschaften aber scheint eher eine 15:1-Spaltung vorzuliegen. Es ist also wahrscheinlich,

daß eine bifaktorielle monarchiale Vererbungsweise vorliegt, so daß, je nach der Konstitution des Elters, eine 3:1- oder eine 15:1-Spaltung auftreten kann. Nennen wir die beiden Gene $ster_1$ und $ster_2$, dann wären im ersten Fall die Eltern entweder $+ster_1ster_2ster_2$ oder $ster_1ster_1+ster_2$ gewesen, im zweiten Fall aber $+ster_1+ster_2$. Es ist auch möglich, daß die beiden Gene in ihrer Wirkung nicht vollständig gleich sind, denn die Merkmalsausprägung ist ziemlich variabel.

In einer Anzahl von Nachkommenschaften traten bedeutend mehr Träger des rezessiven Merkmals auf, als man theoretisch erwarten sollte. In diesen Nummern spaltet zugleich auch immer der „defekt“-Charakter heraus, so daß eine Interaktion zwischen den entsprechenden Genen anzunehmen ist. Auf die Beziehung zwischen „defekt“ und „partiell pollensteril“ soll weiter unten ausführlich eingegangen werden.

IV. Die Spaltungsverhältnisse der morphologischen Faktoren

In der Kreuzung Nr. 86, die mit 192 Individuen die größte Nachkommenschaft brachte, war es möglich, auch das genetische Verhalten des Tupfungsfaktors und der „defectum“-Eigenschaften zu untersuchen. Die Elternpflanzen waren, wie in allen folgenden Kreuzungen, normalgestaltet, getupft und voll fertil gewesen. Unter den 119 Weibchen waren 105 normale und 14 defekte, unter den 73 Zwittern waren 71 normale und 2 defekte. Die Homogenität der beiden Spaltungen ist mit $P = 0,08$ bzw. $0,16$ gesichert. Faßt man beide Klassen zusammen, dann besteht die Nachkommenschaft aus 176 normalen und 16 defekten. Unter der Annahme einer 15:1-Spaltung wären 180 normale und 12 defekte zu erwarten. $P = 0,24$, die Übereinstimmung mit der Theorie ist also gut. Wir können deshalb annehmen, daß der defekt-Charakter bifaktoriell bedingt ist und daß keiner dieser beiden Faktoren mit dem Weiblichkeitsgen gekoppelt ist.

Von den 192 Pflanzen waren außerdem 146 getupft und 46 rein grün. Die Übereinstimmung mit einer 3:1-Spaltung (theoretische Erwartung 144:48) ist so gut, daß sich eine statistische Nachprüfung erübrigt. In der Tabelle 6 ist die

Tabelle 5. Die Spaltung von normal/defekt in den Weibchen und Zwittern der Nr. 86

		Normal	Defekt	n	P
Weibchen	gef.	105	14	119	0,16
	erw.	109,1	9,9		
Zwitter	gef.	71	2	73	0,08
	erw.	66,9	6,1		
Summe		176	16	192	

Tabelle 6. Die Spaltungen zwischen getupft/grün und normal/defekt

	Weib- chen	Zwitter	Gesamt	Theo- retisch
Normal rot	79	55	134	135
Normalgrün	26	16	42	45
Defekt rot	10	2	12	9
Defekt grün	4	0	4	3

$P=0,7$

gesamte Aufspaltung der Kreuzung Nr. 86 in bezug auf Weibchen/Zwitter, normal/defekt und getupft/grün zusammengestellt. Unter der Annahme einer bifaktoriellen Vererbung des defekt-Charakters und einer monofaktoriellen des Tupfungsfaktors werden bei unabhängiger Kombination der Gene sowohl unter den Weibchen als auch unter den Zwittern 45 normal rote, 15 normal grüne, 3 defekt rote und 1 defekt grünes erwartet. Wie die Tabelle zeigt, entsprechen die gefundenen Zahlen den erwarteten mit einem P von $0,7$, die Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung ist also außerordentlich gut. Man kann somit

als erwiesen ansehen, daß weder der Weiblichkeitsfaktor F , noch die beiden defekt-Gene, die wir def_1 und def_2 nennen wollen, noch der Tupfungsfaktor g miteinander gekoppelt sind.

Spaltungen nach getupft und grün sind in anderen Nummern nicht aufgetreten, wohl aber Spaltungen nach normal und defekt. In der Nr. 120 stimmen die Zahlen mit einer 15:1-Spaltung überein, ebenso wie in der eben dargestellten Nr. 86. In den Nr. 105, 108 und 111 dagegen trat eine 3:1-Spaltung auf. Die für diese Kreuzung verwendeten Eltern müssen also entweder $+def_1 def_2 def_2$ oder $def_1 def_1 + def_2$ gewesen sein. Das heißt, in beiden Eltern war eines der beiden Faktorenpaare homozygot, das andere heterozygot enthalten. Unter diesen Umständen ist eine 3:1-Spaltung zu erwarten. Eine 7:1-Spaltung, wie sie nach der Kombination eines einfach und eines doppelt heterozygoten Elters erwartet wird, ist in unseren Kreuzungen nicht aufgetreten.

Nun soll noch kurz auf die Beziehungen zwischen den Faktoren für partielle männliche Sterilität und den übrigen Genen eingegangen werden. Zwischen F einerseits und $ster_1$ und $ster_2$ andererseits besteht keine Kopplung, denn sonst wäre es nicht möglich, daß die in ff homozygoten Zwitter in den $ster$ -Genen normal spalten. Die Grüntupfung und $ster$ traten nicht zusammen auf, deshalb kann an Hand der vorliegenden Untersuchungen nichts über die Kopplung zwischen diesen Genen ausgesagt werden. Die Spaltungsverhältnisse, in denen sowohl defekt-Gene wie auch $ster$ -Faktoren auftraten, sind sehr kompliziert. In einer Reihe von Nachkommenschaften spalteten beide Charaktere heraus, und zwar sowohl aus den Kreuzungen Weibchen $\times$ Zwitter als auch aus den Selbstungen der Zwitter. Da das Sterilitätsgen sich nur an den Zwittern manifestieren kann, sind die letzteren für diese Untersuchungen besser geeignet wegen der größeren Individuenzahlen. Wie aus den vorhergegangenen Analysen zu entnehmen ist, sind beide Merkmale bifaktoriell bedingt, bei gleichsinnig monarchialer Genwirkung. Die normalen Elternpflanzen, deren genetische Konstitution unbekannt ist, können deshalb in jedem der beiden Merkmale

Tabelle 7. Die Spaltungen zwischen normal und defekt

Lfd. Nr.	♀ ♀		♂ ♂		Zusammen		Theo- retisch	P
	normal	defekt	normal	defekt	normal	defekt		
88	52	17	47	8	99	25	3:1	0,22
105	7	1	9	3	16	4	3:1	0,6
108	12	3	5	4	17	7	3:1	0,4
111	26	9	31	16	57	25	3:1	0,2
Σ					189	61		
			theor. erw.		187,5	62,5		0,8
120	20	1	17	2	37	3	15:1	0,89

wie 15:1 spalten, wenn sie doppelt heterozygot oder 3:1, wenn sie einfach heterozygot sind. Bei 2 solchen Merkmalen gibt es aber 4 verschiedene Möglichkeiten für die genetische Konstitution der Eltern. Entweder können beide Genpaare doppelt heterozygot, oder das erste doppelt und das zweite einfach, das erste einfach und das zweite doppelt, oder beide einfach heterozygot vorhanden sein.

Dementsprechend sind die Spaltungsverhältnisse, die wir erwarten müssen, entweder 225:15:15:1, 45:15:3:1, 45:3:15:1 oder 9:3:3:1. Wie die Zusammen-

Tabelle 8. Die Spaltung zwischen „deformiert“ und „partiell pollensteril“

Aufzucht Nr.	n		Spaltungsverhältnis				Spaltung normal:fertil	Spaltung normal:steril	Hypo- these 1	x ²	P
			normal fertil	normal steril	defekt fertil	defekt steril					
111	47	gef. erw.	27 26,3	4 2,9	3 2,9	13 14,6	31:16 = 2 :1 1,7:1	30:17 = 1,8:1 1,7:1	4c	0,8	0,86
120	19	gef. erw.	14 10,7	2 3,6	2 3,6	1 1,2	16: 3 = 5,3:1 3:1	16:3 = 5,3:1 3:1	4a	2,1	0,5
126	22	gef. erw.	14 12,4	3 4,1	0 1,4	5 4,1	17: 5 = 3,4:1 3:1	14:8 = 1,8:1 2,6:1	4b	1,0	0,8
127	43	gef. erw.	33 24,3	1 2,7	1 2,7	8 13,5	34: 9 = 3,8:1 2,6:1	34: 9 = 3,8:1 2,6:1	4c	5,2	0,2
132	68	gef. erw.	37 38,25	11 12,75	3 4,25	17 12,75	48:20 = 2,4:1 3:1	40:28 = 1,4:1 2,6:1	4b	2,2	0,5
133	15	gef. erw.	8 10,5	6 3,4	0 0,2	1 0,7	14: 1 = 14:1 15:1	8: 7 = 1,1:1 2,6:1	2b	2,5	0,4
134	43	gef. erw.	27 30,2	2 2,0	9 7,4	5 3,3	29:14 = 2,1:1 2:1	26: 7 = 5,1:1 7:1	3b	1,5	0,7
136	42	gef. erw.	36 36,9	2 2,5	3 1,8	1 0,8	38: 4 = 9,5:1 15:1	39:3 = 13:1 11,8:1	1b	1,2	0,89
137	37	gef. erw.	24 26,1	4 6,4	0 0,6	6 4,1	28: 6 = 4,7:1 7:1	24:10 = 2,4:1 2,6:1	2c	2,1	0,5

¹ Vgl. Tabelle 9.

Tabelle 9. Die zu erwartenden Spaltungsverhältnisse bei zwei bifaktoriell bedingten Merkmalen, unter Berücksichtigung verschiedener Dominanzverhältnisse

Elternkonstitution		Erwartete Spaltung				Spaltung normal: defekt	Spaltung fertil: steril
		normal fertil	normal steril	defekt fertil	defekt steril		
1. +d ₁ +d ₂ +st ₁ +st ₂	a	225	15	15	1	15 :1	15 :1
	b	225	15	11	5	15 :1	11,8:1
	c	225	11	11	9	11,8:1	11,8:1
2. +d ₁ +d ₂ +st st st	a	45	15	3	1	15 :1	3 :1
	b	45	15	1	3	15 :1	2,6:1
	c	45	11	1	7	7 :1	2,6:1
3. +d d d +st ₁ +st ₂	a	45	3	15	1	3 :1	15 :1
	b	45	3	11	5	3 :1	7 :1
	c	45	1	11	7	2,6:1	7 :1
4. +d d d +st st st	a	9	3	3	1	3 :1	3 :1
	b	9	3	1	3	3 :1	1,7:1
	c	9	1	1	5	1,7:1	1,7:1

a Normale Spaltung.

b Die 4×d, 3×st-Pflanzen sind defekt-steril.

c Die 4×d, 3×st- und die 3×d, 4×st-Pflanzen sind defekt-steril.

stellung in Tabelle 8 zeigt, ist die Spaltung jedoch offenbar gestört, denn es treten meistens zuviele Rezessive auf. Manchmal sind nur zuviele Pollensterile vorhanden, zuweilen aber auch zuviele Pollensterile und zuviele Defekte. Es

wurde nun die Hypothese geprüft, ob bei gleichzeitiger Anwesenheit von mehreren rezessiven Allelen beider Genpaare eine Interaktion erfolgt, die einen Dominanzwechsel zur Folge hat. Es wäre denkbar, daß die 4fach rezessiven Defekten auch dann noch pollensteril sind, wenn sie nur ein dominantes Normalgen und 3 ster enthalten, und daß die 4fach rezessiven Pollensterilen zugleich auch defekt sind, wenn sich nur ein dominantes Normalgen und 3 def besitzen. Auch unter diesen Voraussetzungen wurden die zu erwartenden Spaltungsverhältnisse geprüft und in der Tabelle 9 zusammengestellt. Der Vergleich der empirisch gefundenen Zahlen zeigte, daß einige von den Spaltungen recht gut mit der ersten, einige mit der zweiten Hypothese übereinstimmen. In der Nr. 120 entsprechen die gefundenen Zahlen einem ungestörten 9:3:3:1-Verhältnis, aber die Nr. 126, 132, 133, 134 und 136 lassen sich besser verstehen, wenn man zugrunde legt, daß sowohl die defekten $4 \times \text{def}$, $3 \times \text{ster}$ -Individuen pollensteril als auch die pollensterilen $4 \times \text{def}$, $3 \times \text{ster}$ -Pflanzen zugleich auch defekt sind. Trotz der relativ kleinen Nachkommenschaften stimmen die gefundenen Zahlen meistens recht gut mit den theoretisch erwarteten überein. Die meisten Pflanzen waren demnach in beiden Merkmalen einfach heterozygot, nämlich 5 von 9 geprüften; eine Pflanze war in beiden Merkmalen doppelt heterozygot, 2 waren doppelt heterozygot im ersten, einfach heterozygot im zweiten Merkmal und eine Pflanze war einfach heterozygot im ersten und doppelt heterozygot im zweiten Merkmal. Darüber hinaus ist anzunehmen, daß unter dem Einfluß der 4fach rezessiven Allele des einen der beiden Genpaare ein Dominanzwechsel des anderen stattfindet, so daß auch die einfach Dominierenden die rezessive Merkmalsausprägung erfahren. In den meisten Nachkommenschaften (5mal) ist nur die Pollensterilität durch Dominanzwechsel betroffen, während 3mal auch der defekt-Charakter beeinflusst wurde. Einmal wurde kein Dominanzwechsel festgestellt. Die Erscheinung ist also offenbar labil.

D. Theoretischer Teil

I. Die Grundlagen der Gynodiözie

Der Begriff der Gynodiözie ist nicht mit dem gelegentlichen Auftreten von Weibchen in einer Zwitterpopulation definiert. Vielmehr ist darin, wie LEWIS mehrfach ausführte, zugleich die Voraussetzung eingeschlossen, daß Weibchen und Zwitter immer in konstanten Zahlenverhältnissen auftreten. Mit andern Worten, das Geschlechtsverhältnis muß stabil sein, wenn man von Gynodiözie sprechen will. Daraus ergibt sich, daß einfache dominante oder rezessive Gene für Weiblichkeit bzw. für männliche Sterilität niemals für sich allein Gynodiözie bedingen können. Wenn nämlich eine derartige Population einige Jahre sich selbst überlassen bleibt, werden die Weibchen eliminiert.

Angenommen, es handle sich um ein dominierendes Gen für Weiblichkeit, dann werden die heterozygoten Weibchen, die nur von den homozygot rezessiven Zwittern bestäubt werden können, immer zur Hälfte Weibchen, zur Hälfte Zwitter abspalten. Die Zwitter dagegen bringen nur Zwitter. Vorausgesetzt, beide Formen hätten die gleiche Fortpflanzungsrate und in der Ausgangspopulation wären gleich viel Weibchen und Zwitter vorhanden, dann würden in der 2. Generation nur noch $\frac{1}{4}$ der Nachkommen weiblich sein, in der 3. Generation $\frac{1}{8}$, in der 4. $\frac{1}{16}$ usw. Der Anteil der dominierenden Weibchen würde also von Generation zu Generation abnehmen, nach der Formel $1/2^G$, und am Ende wären die Weibchen alle wieder verschwunden.

Nicht ganz so schnell verläuft die Eliminierung der Weibchen bei rezessiver Vererbung der Weiblichkeit. Von 25% Weibchen in der F_2 sinkt ihr Anteil in den folgenden Generationen auf 16,67%, 12,3%, 9,55% usw. entsprechend den Gesetzmäßigkeiten für den Rezessivenrückgang bei Auslese eines Fremdbefruchters nach der Befruchtung. (Da die Weibchen keinen Pollen liefern, kommen nur ihre Eizellen in den Fortpflanzungsprozeß hinein.)

Auf einzelnen dominierenden oder rezessiven Genen beruhende Weiblichkeit bewirkt also noch keine Gynodiözie. Anders ist es dagegen, wenn das Plasmon für die Ausprägung des Geschlechts verantwortlich ist. In diesem Fall produzieren die Weibchen lauter Weibchen, die Zwitter lauter Zwitter, und, gleiche Fortpflanzungsraten vorausgesetzt, entstehen beide Formen im gleichen Verhältnis. Das System ist also stabil. Ebenso ist es bei der monohybrid bedingten reinen Diözie. Auch hier entstehen beide Geschlechtsformen im gleichen Verhältnis, und die eine kann sich nicht ohne die andere fortpflanzen.

Diözie sowie plasmatisch gesteuerte Gynodiözie sind deswegen häufig; beide stellen stabile Systeme dar, in denen das Verhältnis der verschiedenen Geschlechtsformen zueinander gleich und konstant ist. Kerngesteuerte Gynodiözie dagegen erfordert ein System von mehreren Genen, die zusammenwirken müssen, um den Bestand der Weibchen zu sichern. Dieses Problem ist bei *Origanum* und bei *Salvia nemorosa* auf verschiedene Weise gelöst. Bei *Origanum* sorgt ein Genpaar für Stabilität, nämlich ein Weiblichkeitsgen und ein Hemmungsfaktor, der ihm entgegen wirkt, wobei die Letalität der doppelt Homozygoten noch hinzu kommt. Bei *Salvia* ist die Lebensfähigkeit der Zwitter durch eine Anzahl von Letalfaktoren eingeschränkt, von denen einer mit dem Gen für Zwitterigkeit gekoppelt sein muß. Auch auf diese Weise wird dafür gesorgt, daß die Weibchen nicht eliminiert werden, ja es ist sogar stets ein Überschuß an Weibchen zu finden.

II. *Salvia* und *Satureja*

Das Beispiel von *Salvia* ist deshalb besonders interessant, weil hier der Effekt einer plasmatisch gesteuerten Gynodiözie kopiert wird. Hätten wir durch Zufall in der Population nur die Linie der Pflanze P 4 vorgefunden, nämlich die ausnahmsweise überlebenden Pflanzen, die den Letalfaktor homozygotisch enthalten, und die zugehörigen Weibchen, dann würden alle Weibchen nur oder überwiegend Weibchen hervorbringen, während die Zwitter zwar nur wenige, aber lauter zwittrige Nachkommen hätten. Diese Population würde sich also ebenso verhalten wie *Satureja*. Schon EAST (1934, zit. nach CASPARI) hat darauf hingewiesen, daß es auch noch andere Deutungsmöglichkeiten für solche Fälle gibt, und das vorliegende Beispiel brachte die Bestätigung. Nun ist nicht anzunehmen, daß etwa alle Fälle von plasmatisch bedingter Gynodiözie in Wirklichkeit karyotisch gesteuert seien. Dann müßte man annehmen, daß z.B. bei *Cirsium* (CORRENS 1916) und *Aquilegia* (KAPPERT 1943) sämtliche eingekreuzten Rassen und Arten alle denselben Letalfaktor besessen hätten, und das ist unwahrscheinlich. Auch bei Mais ist die plasmatische Vererbung der Pollensterilität durch RHOADES (1943) einwandfrei nachgewiesen worden. Es ist andererseits auch nicht ausgeschlossen, daß bei *Salvia* auch das Plasma außer dem Kern eine Wirkung auf die Geschlechtsausbildung hat; wir können nur sagen, daß sich die Plasmen von Weibchen und Zwittern nicht unterscheiden. Das gemeinsame Plasma könnte deswegen doch mit F und f in verschiedener Weise zusammenwirken.

III. Die Kopplung der Gene von *Salvia nemorosa*

Die Vererbungsweise von Letal- und Sterilitätsfaktoren wäre noch besser zu verfolgen, wenn es gelänge, die betreffenden Chromosomen mit anderen Genen zu markieren. Bei *Salvia* wurden im ganzen 6 Gene untersucht, aber es fand sich keine Kopplung zwischen irgendeinem Paar, obwohl die Chromosomenzahl nur $n = 7$ beträgt (LINNERT 1955). Die Wahrscheinlichkeit, unter ihnen keine Kopplung zu finden, ist nicht sehr groß. Aber das cytologische Verhalten gibt einen Hinweis dafür, daß möglicherweise die Zahl der genetisch feststellbaren Kopplungsgruppen größer ist als sieben. Wie in einer früheren Arbeit festgestellt wurde, beträgt die durchschnittliche Chiasmafrequenz je Bivalent nur 1,2, d. h., daß in den meisten Bivalenten nur ein Chiasma gebildet wird. Dazu ist die Lage der Chiasmen mehr oder weniger an den Grenzen zwischen Eu- und Heterochromatin lokalisiert. So ist also zwischen den zu beiden Seiten einer bevorzugten Chiasmabildungsstelle gelegenen Genen ein Austausch von annähernd 50% zu erwarten, während andererseits ein großer Teil der Gene eines Schenkels annähernd absolute Kopplung zeigen müßte. Die Zahl der auffindbaren Kopplungsgruppen wäre in diesem Fall nicht 7, sondern sie könnte bis zu 14 ansteigen. Damit verringert sich zugleich auch die Chance, unter 6 Genen 2 gekoppelte zu finden, und besonders die, ein mit F und dem Letalfaktor gekoppeltes Gen tatsächlich zu finden.

Alle nicht mit dem f-Faktor gekoppelten Gene spalten natürlich normal und geben keinen Hinweis dafür, ob der f-Faktor wirklich mit einem Letalfaktor gekoppelt ist. So ist der letzte Nachweis dafür, daß das Auftreten von rein weiblichen Nachkommenschaften auf der Wirksamkeit von Letalfaktoren beruht, vorläufig nicht zu führen. Indessen sehen wir im Augenblick keine bessere Erklärungsmöglichkeit als die oben gegebene.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei *Salvia nemorosa* wurde eine Form der Gynodiözie festgestellt, die nicht plasmatisch bedingt ist. Ein dominanter Faktor für Weiblichkeit F bewirkt, daß in der Regel die Weibchen zur Hälfte zwittrige Nachkommen haben. Auch rein weibliche Nachkommenschaften und solche, in denen mehr Weibchen als Zwitter enthalten sind, kommen vor. Als Erklärung dafür wird angenommen, daß ein mit f gekoppelter Letalfaktor und wahrscheinlich noch weitere Letal- und Subletal-faktoren die Entstehung der Zwitter verhindern oder ihre Fertilität einschränken.

Das ist der zweite bekanntgewordene Fall einer karyotisch gesteuerten Gynodiözie. Er ist deshalb besonders interessant, weil ein Teil der Genotypen, in bestimmter Zusammenstellung, dem *Satureja*-Modell entspricht. Es wird diskutiert, wie weit bei den verschiedenen Vererbungsmechanismen die Stabilität des gynodiözischen Systems gewahrt wird.

Literatur

- CASPARI, E.: Cytoplasmic inheritance. *Adv. Genet.* **2**, 1—66 (1948). — CORRENS, C.: Untersuchungen über die Geschlechtsbestimmungen bei Distelarten. *Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss. Physik.-math. Kl.* **20**, 448—477 (1916). — Nicht mendelnde Vererbung. In *Handbuch der Vererbungswissenschaft*, Bd. II H, S. 1—159. 1937. — EAST, E. M.: The

nucleus-plasma problem. Amer. Naturalist **68**, 289—303 (1934). — HRUBY, K.: Some new *Salvia* species hybrids, their description and analysis. Stud. Plant Phys. Lab. Univ. Prag **5**, 1—73 (1935). — KAPPERT, H.: Untersuchungen über die Plasmonwirkungen bei *Aquilegia*. (Gynodiözie-Heterosis-Gestalt des Sporns). Flora (Jena) **37**, 95—105 (1943). — LEWIS, D.: Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. New Phytologist **40**, 56—63 (1941). — LEWIS, D., and L. K. CROWE: Male sterility as an outbreeding mechanism in *Origanum vulgare*. Heredity (Lond.) **6**, 136 (1952). — The genetics and evolution of gynodioecy. Evolution (Lancaster, Pa.) **10**, 115—125 (1956). — LINNERT, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Euchromatin und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasma-bildung bei *Salvia*-Arten. Chromosoma **7**, 90—128 (1955). — Cytologische Grundlagen für Sterilitätserscheinungen in der Gattung *Salvia*. Züchter **25**, 237—241 (1955). — Geschlechtsvererbung. Eine Übersicht über die wesentlichen genetischen Grundlagen. Z. Bot. **45**, 77—96 (1957). — RHOADES, M. M.: Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea Mays*. Science (Lancaster, Pa.) **73**, 340—341 (1931). — The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea Mays*. J. Genet. **27**, 71—93 (1933).

Dr. GERTRUD LINNERT,

Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität,
Berlin-Dahlem, Albrecht-Thaer-Weg 6

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM DER HERABREGULIERUNG DER CHROMOSOMENZAHLE IN EXPERIMENTELL ERZEUGTEN POLYPLOIDEN PFLANZEN

Von

WERNER GOTTSCHALK

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. August 1957)

A. Einleitung

Es ist seit langem bekannt, daß experimentell hergestellte polyploide Pflanzen ihren Polyploidiegrad in den Folgegenerationen wohl in der Regel beibehalten, daß in der Nachkommenschaft polyploider Organismen aber gelegentlich wieder diploide auftreten. Die reduzierte Chromosomenzahl kann z. T. auf eine parthenogenetische Entwicklung der Eizelle der polyploiden Mutterpflanze zurückgeführt werden (EINSET 1941, DUARA und STEBBINS 1952) und steht damit nicht unmittelbar mit dem Abregulierungsproblem in Verbindung. In anderen Fällen muß jedoch angenommen werden, daß nach Ablauf mitotischer oder auch meiotischer Unregelmäßigkeiten Keimzellen mit der haploiden statt der diploiden Chromosomenzahl entstehen, daß also eine echte Herabregulierung der Chromosomenzahl auf den Ausgangszustand erfolgt ist. In der Nachkommenschaft derartiger „instabiler“ polyploider Pflanzen oder Pflanzenregionen können somit in Verbindung mit einer normalen sexuellen Fortpflanzung diploide Organismen auftreten (GREIS 1940, SCHWANITZ 1941, BROWN 1947, CHRISTOFF und CHRISTOFF 1948, VAARAMA 1949, HERTZSCH 1951, TAKENAKA 1951, EMSWELLER und STEWART 1951, PETERS 1954, RAMAN und KRISHNASWANNY 1955). Auch in somatischen und generativen Geweben diploider und polyploider Organismen wurden vereinzelt Kerne mit niedrigeren Chromosomenzahlen gefunden, die wenigstens zum Teil in Verbindung mit Abregulierungsvorgängen entstanden sein dürften (LOVE 1936, ROSENDAHL 1944, HUSKINS 1948, KODANI 1948, HANNA 1955). Über nähere Einzelheiten der eben erwähnten Vorgänge — etwa die Ursachen der Abregulierung, ihren Zeitpunkt während der Ontogenese, ihr Ausmaß innerhalb eines polyploiden Bestandes, vor allem aber über den zytologischen Mechanismus der Rückregulierung — sind wir nur spärlich unterrichtet.

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Bearbeitung dieses Problems liegt darin, daß sich die abregulierenden Pflanzen morphologisch nicht von den „stabilen“ Polyploiden des Bestandes unterscheiden. Es sind daher umfangreiche zytologische Untersuchungen an vielen Versuchspflanzen notwendig. Sie können nicht mit Hilfe zytologischer Schnellmethoden vorgenommen werden, weil das Ausmaß der Regulierungsprozesse innerhalb einer zytologisch labilen Pflanze häufig sehr gering ist. Aber auch wenn ein zur Rückregulierung neigendes Individuum gefunden ist, hat man zunächst noch keinen Anhalt, in welchem ontogenetischen Entwicklungsstadium und in welcher Pflanzenregion die Prozesse ablaufen. Man muß folglich die ganze Pflanze zytologisch abtasten. Verläuft die Regulierung in einem Sproßvegetationskegel, so wird man wohl ihren Zeitpunkt während der Ontogenese, kaum aber ihren Mechanismus aufklären können. Man müßte sonst alle Vegetationskegel der Pflanze planmäßig in Schnittserien nach abregulierten Zellen durchsuchen, eine sehr langwierige und

wenig erfolgversprechende Arbeit, weil oft nur Einzelzellen von diesem Vorgang betroffen werden und weil Schnittpräparate wenig geeignet erscheinen, diese komplizierten Vorgänge aufzuklären.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden bei der Bearbeitung unseres Versuchsmaterials nicht die Sproßvegetationskegel, sondern die wesentlich besser zugänglichen Antheren untersucht, weil die Chromosomenzahlen der verschiedensten Pflanzenregionen auf diese Weise relativ schnell ermittelt werden konnten. Voraussetzung war ein Objekt mit vielen Blüten und langer Blühperiode. Beide Forderungen werden in nahezu idealer Weise von der Tomate erfüllt.

Bei der Versuchsanstellung sind wir von der zunächst rein hypothetischen Vorstellung ausgegangen, daß ein polyploider Organismus um so eher zur Abregulierung neigen wird, je höherploid er ist, denn die zytologische Stabilität einer Pflanze nimmt erfahrungsgemäß — vor allem bei Betrachtung der Meiosis — mit zunehmendem Polyploidiegrad ab. Es war also zunächst unsere Absicht, möglichst hochpolyploide Pflanzen herzustellen. Wir haben versucht, dieses Ziel durch eine mehrmalige Colchicinbehandlung zu erreichen. Die hierfür notwendigen Experimente wurden nicht mit Hilfe der Wattebausch-Methode durchgeführt, weil dabei häufig Chimären entstehen, die für die Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung ungeeignet sind. Wir haben vielmehr Samen auf Colchicin-Agar keimen lassen und erhielten bei der *ersten* Behandlung — also bei der Keimung *diploiden* Saatguts — nahezu ausschließlich tetraploide Organismen mit einheitlichen Chromosomenzahlen im Sproßsystem. Die Ergebnisse der *zweiten* Colchicinbehandlung — der Keimung *tetraploider* Samen auf Colchicin-Agar — führte hingegen zu ganz unerwarteten Ergebnissen. Die erhofften oktoploiden Pflanzen blieben aus oder starben, falls sie wirklich zustande gekommen waren, in frühesten Stadien ihrer Entwicklung ab. Es wurden wohl einige Pflanzen mit Chromosomenzahlen zwischen der tetra- und oktoploiden Valenz erhalten, sie zeigten jedoch keine Abregulierungserscheinungen. Daneben traten unerwarteterweise rein oder annähernd tetraploide Organismen auf, bei denen die 2. Colchicinbehandlung offenbar nicht oder nur schwach wirksam gewesen war, in denen jedoch Abregulierungen nachgewiesen werden konnten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit einer derartigen zur Regulierung neigenden Versuchspflanze, an der interessante Einblicke in das Wesen der Abregulierung gewonnen werden konnten.

B. Material und Methode

Am 7. 2. 56 wurden 80 Samen tetraploider Tomaten der Handelssorte „Immun“ in Petrischalen auf Colchicin-Agar ausgelegt. Als Kulturmedium diente eine Mischung einer 2%igen erwärmten Agarlösung mit einer 0,5%igen Colchicininlösung im Verhältnis von 1:1 (SWAMINATHAN 1950). Nach der Keimung wurden die Keimlinge gut ausgewaschen und auf sterilisierten Knop-Agar umgesetzt. Die Bildung von Wurzelhaaren lief nur sehr zögernd ab und unterblieb bei vielen Keimlingen ganz. Da bald Verpilzung eintrat, wurden die Pflänzchen nach Entfaltung ihrer Keimblätter in Töpfe pikiert und im Warmhaus unter Glasglocken weiter kultiviert. Das verwendete Saatgut entstammte tetraploiden Tomaten, die im Vorjahre auf die gleiche Weise aus diploidem Saatgut gewonnen worden waren.

Von den 80 ausgelegten Samen standen schließlich nur 12 Pflanzen für zytologische Untersuchungen zur Verfügung, von denen 6 habituell so stark von tetraploiden Tomaten abwichen, daß sie schon nach morphologischen Gesichtspunkten als höherpolyploid angesprochen werden konnten. Nur 2 dieser 6 Pflanzen erreichten die Blühperiode, brachten jedoch nur wenige Knospen. Ihre Chromosomenzahlen lagen bei $2n = 64-70$ und $2n = 84-85$, waren also noch nicht oktoploid (die haploide Chromosomenzahl von *Lycopersicon esculentum* beträgt $n = 12$). Abregulierungsvorgänge konnten in diesen beiden Pflanzen nicht

beobachtet werden. Die restlichen 6 überlebenden Versuchspflanzen besaßen entweder rein tetraploide Chromosomenzahlen oder Zahlen, die in der Größenordnung der tetraploiden Valenz lagen. Eine dieser 6 Pflanzen (Protokoll-Nr. 934) wies z. T. recht komplizierte chromosomale Verhältnisse auf und zeigte zu ganz verschiedenen Zeitpunkten ihrer Ontogenese Abregulierungserscheinungen, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden. Der Versuchspflanze wurden während ihrer gesamten Blühperiode laufend Knospen entnommen und zytologisch untersucht. Hierzu wurden die Antheren in Carnoy 3:1 fixiert, mit Karmin-Essigsäure unter Eisenzusatz nach GEITLER (1949) gefärbt und als Quetschpräparate verarbeitet.

C. Empirischer Teil

Die Pflanze Nr. 934 verharrte nach der Colchicinbehandlung zunächst etwa 5 Wochen lang im Keimlingsstadium, ohne daß sichtbare Entwicklungsvorgänge abliefen. Dann nahm sie ihre ontogenetische Weiterentwicklung auf und wuchs zu einem sehr kräftigen, vielfach verzweigten Exemplar heran. Sie trat Mitte Juli in ihre Blühphase ein und brachte bis Ende Januar reichlich Blüten. Anfang Februar wurde sie stark zurückgeschnitten und durch Stecklinge vermehrt; Mitte Februar ging die Mutterpflanze ein; eine sexuelle Fortpflanzung kam nicht zustande. Morphologisch zeigte die Pflanze die für tetraploide Tomaten charakteristischen Merkmale. Im Verlauf der Ontogenese wurden insgesamt 20 Infloreszenzen fixiert und zytologisch bearbeitet. Die Lage dieser Infloreszenzen und die Fixierungstermine sind aus der schematischen Darstellung (Abb. 16) ersichtlich.

Die *Chromosomenzahlen* der Pollenmutterzellen (PMZ) waren nicht einheitlich. Es herrschte wohl die Zahl von $2n = 48$ — also die rein tetraploide Valenz — vor, es fanden sich daneben jedoch in vielen Regionen der Pflanze hyper- und hypotetraploide Zahlen, die von $2n = 45$ —53 variierten. Diese Variabilität hatte zur Folge, daß auch in den Gonen erhebliche Schwankungen der Chromosomenzahlen vorkamen und daß 24chromosomige Gonen in den verschiedenen Regionen der Pflanze in recht unterschiedlicher Häufigkeit gebildet wurden. Die Versuchspflanze war darüber hinaus noch durch eine Vielfalt meiotischer Störungen charakterisiert, die ein Ausmaß erreichten, das weit über die sonst bei tetraploiden Organismen realisierten Verhältnisse hinausgeht. Sie sind offenbar Ausdruck einer gewissen zytologischen Labilität, die möglicherweise eine der Ursachen der Neigung zur Abregulierung ist (vgl. Kap. 2).

1. Die Abregulierung

In mehreren Regionen der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934 traten vereinzelt PMZ mit der diploiden und Tetradenkerne mit der haploiden Chromosomenzahl auf, die als Folge von Abregulierungsvorgängen anzusprechen sind. Das Vorhandensein diploider PMZ in tetraploiden Antheren kann nur so gedeutet werden, daß die fraglichen Zellen in Verbindung mit Regulierungsprozessen *vor Beginn der Meiosis*, also während der prämeiotischen Mitosen, entstanden sind. Im Gegensatz hierzu wurden des öfteren auch Abregulierungsvorgänge *während des meiotischen Stadienablaufs* beobachtet, die in der Folge näher besprochen werden sollen.

a) *Abregulierungsvorgänge während der Meiosis.* In einer völlig störungsfrei verlaufenden Meiosis von $4n$ *Lycopersicon esculentum* werden 4 Gonen mit je 24 Chromosomen gebildet. Im Verlauf meiotischer Störungen können bei der bearbeiteten Versuchspflanze einzelne Tetradenkerne mit der haploiden Chromosomenzahl entstehen oder mit Zahlen, die in der Größenordnung der haploiden Valenz liegen. So wurden z. B. die Kombinationen $13 + 14 + 23 + 46$ (Abb. 1) oder $11 + 22 + 29 + 34$ u. a. in der 2. Telophase gefunden. Nun ist das Auftreten von Kernen mit der haploiden Chromosomenzahl nicht immer mit dem Phänomen der Abregulierung korreliert. Es kommt ja nicht darauf an, daß 12-chromosomige Gonen gebildet werden, entscheidend ist vielmehr, daß die Gonen

ein vollständiges Genom enthalten. Erst dann werden die aus ihnen hervorgehenden spermatogenen Kerne in der Lage sein, durch Befruchtung gleichgestalteter Eizellen einen diploiden Organismus zu bilden. Nur wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, können wir von echter Abregulierung sprechen.

Dieser Nachweis ist sehr schwierig zu führen, denn in der 2. meiotischen Teilung lassen sich bei *Lycopersicon esculentum* keine strukturellen Unterschiede der Chromosomen mehr erfassen, eine Analyse der vorhandenen 12 Chromosomen mit dem Ziel ihrer Identifizierung ist also nicht möglich. Man kann jedoch annehmen, daß der Prozeß der Abregulierung bestimmten Gesetzen gehorcht und folglich überall dort, wo er abläuft, stets mit dem gleichen Mechanismus ablaufen wird. Verteilungen, wie sie oben erwähnt wurden, gehören offenbar nicht hierher, denn die Chromosomenzahl je Tetradenkern variierte nicht nur von PMZ zu PMZ, sondern auch von Tetradenkern zu Te-



Abb. 1. Tetradenkerne einer tetraploiden PMZ von *Lycopersicon esculentum* mit den Chromosomenzahlen 13 + 14 + 23 + 40 (1200fach)

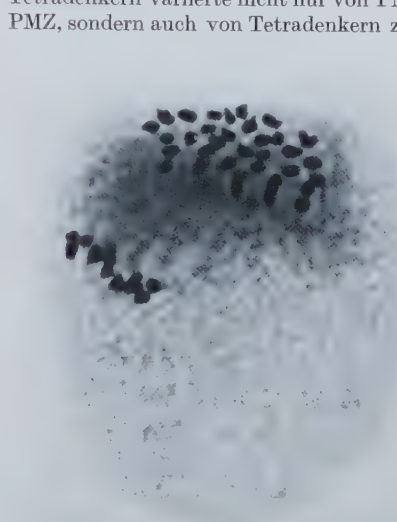


Abb. 2. Chromosomenverteilung von 12 + 35 ($= n - 3n$) in der 1. Telophase einer abregulierenden tetraploiden PMZ (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56, 1200fach)

tradenkern ganz erheblich. Das Auftreten der Chromosomenzahlen 10—13 ist zwar auffällig, weil diese Zahlen etwa mit der haploiden Valenz des Objektes zusammenfallen und weil die beobachteten Verteilungsstörungen weit außerhalb des Normalverhaltens tetraploider Tomaten liegen. Es kann aber nicht im Sinne einer Gesetzmäßigkeit gedeutet werden, die mit dem Phänomen der Abregulierung in Verbindung steht.

In den Antheren einiger Infloreszenzen des Haupt- und zweier Seitensprosse traten jedoch Fehlverteilungen auf, die ohne Zweifel nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten erfolgten und in deren Verbindung ebenfalls Gonen mit der haploiden Chromosomenzahl gebildet wurden. In den betreffenden Gonotokonten kam in der 1. Anaphase nicht die Normalverteilung von 24 + 24 Chromosomen ($= 2n + 2n$), sondern die Verteilung von 12 + 36 Chromosomen, also von $n + 3n$ zustande (Abb. 2). Es konnte noch nicht geklärt werden, wie dieser Vorgang mechanisch abläuft. Er wurde jedoch bei dieser Versuchspflanze in verschiedenen Antheren verschiedener Infloreszenzen mehr als 70mal unmittelbar beobachtet, trat außerdem bereits vor 3 Jahren an einer colchicinierten tetraploiden Tomate häufiger auf. Wenn auch nicht in allen diesen Gonotokonten streng die

Kombination von $12 + 36$ realisiert war, so waren die Abweichungen von diesem Wert doch nur gering. Sie sind z. T. durch die spezifischen chromosomalen Verhältnisse der Versuchspflanze bedingt, die in einer Variabilität der Chromosomenzahl besteht. So besitzt die in Abb. 2 dargestellte PMZ nicht 48, sondern nur 47 Chromosomen, von denen in AI 35 in den oberen und 12 in den unteren Tochterkern gelangten. In allen Fällen handelte es sich jedoch größenordnungsmäßig um eine Aufgliederung der 4 vorhandenen Genome in $n + 3n$.

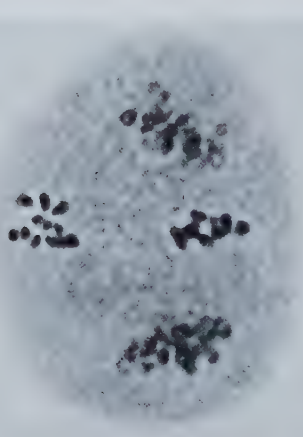


Abb. 3

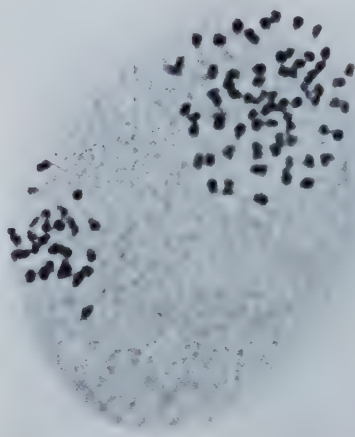


Abb. 4

Abb. 3. Chromosomenverteilung von $n + n + 3n + 3n$ in der 2. Telophase. Die 4 Kerne liegen nicht in der gleichen optischen Ebene, die starken Unterschiede in der Chromosomenzahl der beiden Gruppen sind jedoch deutlich erkennbar (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56; 1200fach)

Abb. 4. Zwei statt vier Tochterkerne in der 2. Telophase einer tetraploiden PMZ mit etwa $28 + 68$ Chromosomen ($= 2n + 6n$). Die Figur geht auf die Verteilung von $n + 3n$ in der 1. Telophase zurück. In der 2. Teilung ist eine Trennung der Chromosomen in ihre Chromatiden erfolgt, es sind jedoch keine Spindeln gebildet worden. Dadurch ist die Chromosomenzahl in den beiden Kernen wieder verdoppelt worden. Die beiden Spalthälften eines jeden Chromosoms liegen häufig noch dicht beieinander (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56; 1200fach)

Diese Befunde beweisen, daß die Verteilung von $n + 3n$ nicht als zufallsbedingte meiotische Unregelmäßigkeit aufgefaßt werden kann. Es liegt hier vielmehr wohl eine gesetzmäßig geregelte meiotische Fehlverteilung vor. Man kann für diese Fälle mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die in einem der beiden Tochterkerne vorhandenen 12 Chromosomen wirklich ein vollständiges Genom darstellen, wenn ich auch vorläufig keine Möglichkeit sehe, dies an meinem Material zytologisch zu beweisen.

Die eben beschriebene abweichende Form der Meiosis führt also in der ersten Telophase zur Verteilung von $12 + 36$ Chromosomen oder ganz allgemein zur Verteilung von $n + 3n$. Würde die Meiosis in diesen Gonotokonten normal weiterlaufen, so müßten 2 haploide und 2 triploide Gonen je Zelle entstehen. Das war in mehreren Gonotokonten auch der Fall, so daß der Prozeß der Abregulierung tatsächlich zum erwarteten Ergebnis — nämlich letzten Endes zur Bildung haploider Keimzellen — führte (Abb. 3).

Es muß auch hierzu wieder bemerkt werden, daß in TII nicht immer streng die Kombination von $12 + 12 + 36 + 36$ gebildet wurde, sondern daß geringe Verschiebungen der

Zahlenwerte eintreten können. Die Verteilung von $13 + 13 + 35 + 35 = (n+1) + (n+1) + (3n-1) + (3n-1)$ dürfte noch auf die bekannten meiotischen Unregelmäßigkeiten tetraploider Organismen zurückzuführen sein. Es wurde jedoch auch die Kombination von $9 + 9 + 39 + 39$ gefunden. Hier ist offenbar die Trennung der 4 Genome in der 1. Anaphase nicht exakt nach dem Schema $n + 3n$ erfolgt, wenn auch die Tendenz hierzu noch deutlich erkennbar ist. Möglicherweise ist die Trennung der 4 Genome teilungsmechanisch mit gewissen Schwierigkeiten verbunden, so daß schon geringe Störungen zu größeren Unregelmäßigkeiten führen können (s. Theoretischer Teil).

In der Mehrzahl der eben beschriebenen Gonotokonten lief die Meiosis nach der Fehlverteilung von $n + 3n$ in AI jedoch nicht normal weiter, es traten vielmehr interessante Komplikationen auf. In der 2. Teilung kam es wohl zu einer Trennung der Chromosomen in ihre Spalthälften, es wurden jedoch keine Spindeln gebildet. Die Chromatiden konnten also nicht auf neu entstehende Tochterkerne verteilt werden. Es kam somit ein Effekt zustande, der demjenigen der Colchicin-Mitose vergleichbar ist und der die Chromosomenzahl der beiden Tochterkerne verdoppelt. Nach Beendigung der Meiosis sind in diesen Gonotokonten also nicht 4 Kerne mit $12 + 12 + 36 + 36$, sondern nur 2 Kerne mit den Chromosomenzahlen 24 und 72, d. h. mit $2n$ und $6n$ vorhanden (Abb. 4).

Es liegt hier ein sehr merkwürdiges Phänomen vor: die am Ende der 1. meiotischen Teilung bereits vollzogene Abregulierung wird in einem Teil der Zellen nicht wirksam, sie wird vielmehr durch das Ausbleiben der Spindelbildung in der 2. Teilung wieder aufgehoben. Auch hier wurden gelegentlich geringe Abweichungen vom theoretischen $2n + 6n$ -Verhältnis beobachtet, die offenbar auf Verteilungsstörungen in der 1. Anaphase dieser Zellen zurückgehen. So besaßen die beiden Kerne des in Abb. 4 wiedergegebenen Gonotokonten $28 +$ etwa 68 Chromosomen. Das Prinzip dieser abnormalen Vorgänge wird durch derartige Unregelmäßigkeiten jedoch nicht beeinträchtigt.

Das gleiche Prinzip — nämlich die Aufgliederung eines polyploiden Kernes in 2 Tochterkerne mit unterschiedlicher Valenz — wurde auch in *triploiden* PMZ beobachtet, die in verschiedenen Regionen der Versuchspflanze inmitten tetraploider Gonotokonten auftraten. Nach Berücksichtigung von etwa 70 Gonotokonten kam nicht die von triploiden Organismen her bekannte Verteilung, sondern ausnahmslos die Verteilung von $n + 2n$ zustande (Abb. 5). Nach Ablauf der Meiosis waren in den fraglichen PMZ somit 2 haploide und 2 diploide Gonen vorhanden. Dieser Befund kann als weiterer Hinweis dafür angesehen werden, daß die Bildung von Gonen mit der haploiden Chromosomenzahl während des meiotischen Stadienablaufs keine Zufallserscheinung ist, sondern daß sie wohl mit Recht als echte Form der Abregulierung angesehen werden kann.

In einer Anthere des Hauptsprosses, die am 30. 12. fixiert wurde, wurde in einer PMZ eine Fehlverteilung beobachtet, die ebenfalls eine bestimmte Gesetzmäßigkeit erkennen läßt und die wohl auch dem eben beschriebenen Regulierungsmodus zugeordnet werden kann. Die betreffende Zelle durchlief das Stadium der 2. Telophase. Die Chromosomenzahlen der Tetradenkerne lagen bei $24 + 24 + 36 + (11 + 1)$, das entspricht den Valenzen $2n + 2n + 3n + n$. Sollte es sich hierbei um einen Fall echter Abregulierung handeln, so müßte er in einem der beiden Tochterkerne im Verlauf der *zweiten* meiotischen Teilung abgelaufen sein. Da diese Teilung in ihrem Wesen der Mitose gleichkommt, würde das bedeuten, daß aus einem diploiden Kern nicht 2 identische Tochterkerne, sondern ein haploider und ein triploider Tochterkern entstanden sind.

Neben der eben beschriebenen Gruppe meiotischer Abregulierungsvorgänge trat z. T. in den gleichen Antheren noch ein zweiter Modus auf, der unter bestimmten Umständen zum gleichen Ergebnis — der Bildung haploider Keimzellen — führt. Die Prophase der 1. meiotischen Teilung der betreffenden Gonotokonten verläuft anscheinend normal. In den Stadien TI bis MII waren jedoch nicht 2, sondern 3 Tochterkerne mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen vorhanden. Einer dieser 3 Kerne enthielt fast in allen Fällen 24 Chromosomen, war also im Sinne einer tetraploiden PMZ normal. Die beiden anderen Kerne, die innerhalb des Gonotokonten in der Regel dicht benachbart lagen, enthielten zusammen

24 Chromosomen. Ihre Zahlen differierten gelegentlich etwas, es wurden jedoch häufig die Verteilung von $12 + 12$, seltener andere Kombinati-

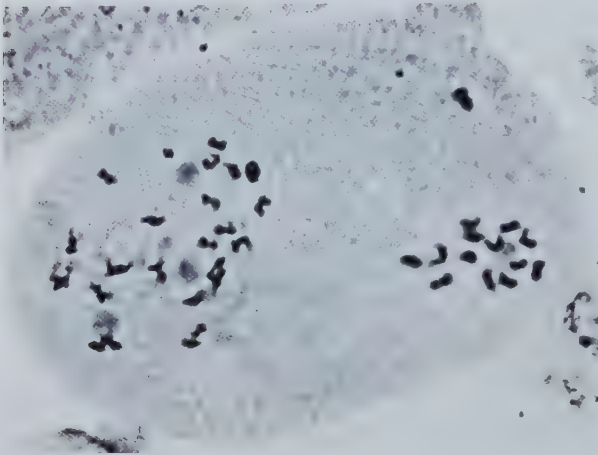


Abb. 5

Abb. 5. Triploide PMZ aus einer tetraploiden Anthere mit der Chromosomenverteilung von $13 + 24 + 1$ ($= n + 2n$) in der Interkinese (Hauptspriß, fixiert am 29. 10. 56; 1200fach)



Abb. 6

Abb. 6. 2. Metaphase einer abregulierenden tetraploiden PMZ: 3 Äquatorialplatten in Seitenansicht mit $12 + 12 + 24$ Chromosomen ($= n + n + 2n$). Hauptspriß, fixiert am 22. 7. 56; 2000fach)

nen wie $10 + 14$ oder gar $7 + 17$ gefunden. Die Verteilung von $24 + 12 + 12$ in TI oder MII dürfte in der aufgefundenen Häufigkeit kaum zufällig zustande gekommen sein. Da sie genomatisch der Verteilung von $2n + n + n$ entspricht, dürfte vielmehr auch hier eine Gesetzmäßigkeit vorliegen (Abb. 6). *Es hat also den Anschein, als würde bereits in den letzten Stadien der 1. meiotischen Teilung in einem der beiden Tochterkerne eine Trennung der Genome zumindest angestrebt und in vielen Fällen auch erreicht.* In der 2. Metaphase dieser Gonotokonten waren 3 selbständige Äquatorialplatten mit eigenen Spindeln vorhanden, in denen eine normale Wanderung der Spalthälften zu beobachten war.

Über den Mechanismus der Aufgliederung der diploiden Tochterkerne in 2 selbständige Genome liegen noch keine Untersuchungsergebnisse vor; eine Deutung dieser Befunde wird im Theoretischen Teil der Arbeit versucht. Auch der Zeitpunkt der beschriebenen Vorgänge während des meiotischen Stadienablaufs liegt noch nicht eindeutig fest, er fällt mit großer Wahrscheinlichkeit in das Stadium der Anaphasenwanderung der Chromosomen. Es ist schwierig zu entscheiden, ob die zuletzt geschilderten Befunde wirklich echte Abregulierungsvorgänge darstellen, weil im Zuge dieser Prozesse nicht in allen Fällen die Kombination von $2n + n + n$ in TI oder MII erreicht wird. Immerhin kam diese Verteilung unter 27 Gonotokonten, deren chromosomale Verhältnisse eindeutig geklärt werden konnten, 16mal

zustande; das ist ein Anteil von knapp 60%. Es scheint daher berechtigt, als Ursache dieser Erscheinungen gewisse Gesetzmäßigkeiten anzunehmen und auch diese Form meiotischer Fehlverteilung als echte Abregulierung aufzufassen.

Das Auftreten einiger „Abweicher“ ist m. E. kein Gegenargument für diese Annahme. Es wäre denkbar, daß die Trennung von 24 Chromosomen in 2 komplette, selbständige Genome in mechanischer Beziehung mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist. Geringe Unregelmäßigkeiten während des Ablaufs dieses Vorgangs könnten leicht dazu führen, daß an Stelle der „balancierten“ Kombination von $2n + n + n$ die Kombination von $2n + (n-1) + (n+1)$ entsteht, daß der balancierte Zustand also auf Grund teilungsmechanischer Schwierigkeiten nicht immer vollereicht wird. (Näheres im Theoretischen Teil.) Es sei noch erwähnt, daß auch Zahlen gefunden wurden, aus denen sich keine Gesetzmäßigkeiten mehr erkennen lassen, etwa die Anordnungen $11+18+21$ oder $14+16+18$ in TI bzw. MII (Abb. 7).

Die Kombination von $2n + n + n$ in MII muß nach Abschluß der Meiosis zur Bildung von 6 Gonen führen, von denen 4 die haploide und 2 die diploide Chromosomenzahl besitzen. In Abb. 8 ist ein derartiger Gonotokont in einem Übergangsstadium zwischen der 2. Telo- und Interphase dargestellt. Die 6 Kerne liegen in Gruppen von jeweils 2 Nuclei vor. Die gegenseitige Lage der beiden Kerne einer jeden Gruppe sowie die noch sichtbaren Spindelreste lassen erkennen, daß sie aus einer gemeinsamen Äquatorialplatte hervorgegangen sind. Die Chromosomenzahlen stimmen etwa mit den theoretisch erwarteten Werten von $2n + 2n + n + n + n + n$ überein. In den wenigen Antheren, in denen derartige Bilder gefunden wurden, traten außerdem noch mehr als 160 Gonotokonten



Abb. 7. Interkinese einer tetraploiden PMZ mit 3 Kernen mit $14+16+18$ Chromosomen (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56; 1200fach)



Abb. 8. Übergangsstadium zwischen der 2. Telo- und Interphase einer abregulierenden tetraploiden PMZ. Es sind nicht 4, sondern 6 Kerne mit den Valenzen $2n+2n$ (oben) $+n+n+n+n$ (unten) vorhanden. Zwischen den haploiden Kernen sind noch Reste der Spindeln sichtbar (Hauptspieß, fixiert am 22. 7. 56; 1200fach)

von $2n + 2n + n + n + n + n$ überein. In den wenigen Antheren, in denen derartige Bilder gefunden wurden, traten außerdem noch mehr als 160 Gonotokonten

mit 6 Genen im Stadium der 2. Interphase auf (Abb. 9). Ohne Zweifel haben wir hier das Ergebnis der Metaphase-Kombination von $2n + n + n$ oder einer verwandten Anordnung vor uns.

Leider sind bei *Lycopersicon esculentum* in der späten 2. Telophase sowie in der 2. Interphase trotz der Anwesenheit von Chromozentren keine exakten Chromosomenzählungen mehr möglich. In einigen Fällen konnten die Zahlen für Einzelkerne der PMZ wenigstens annäherungsweise ermittelt werden. Hierbei wurde häufig die Größenordnung der haploiden Valenz festgestellt. So trat in 13 Gonotokonten, die ein Übergangsstadium zwischen der 2. Telo- und Interphase durchliefen und in denen jeweils einer der 6 Kerne ausgezählt werden konnte, 8mal die Chromosomenzahl von 12 oder 13 auf. Es hat also den Anschein, als wäre die Kombination von $2n + n + n$ in den 6kernigen Gonotokonten häufig vertreten gewesen. Man kann daher wohl mit Berechtigung annehmen, daß auf diesem Wege in tetraploiden Pflanzen Keimzellen mit der haploiden Chromosomenzahl entstehen können.

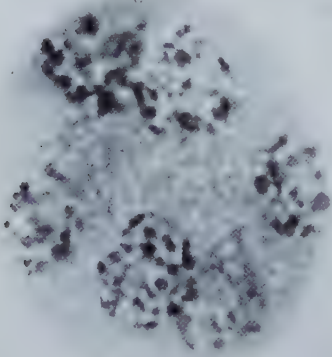


Abb. 9. Gonotokont mit 6 statt 4 Genen nach Abschluß der Meiosis (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56; 1000fach)

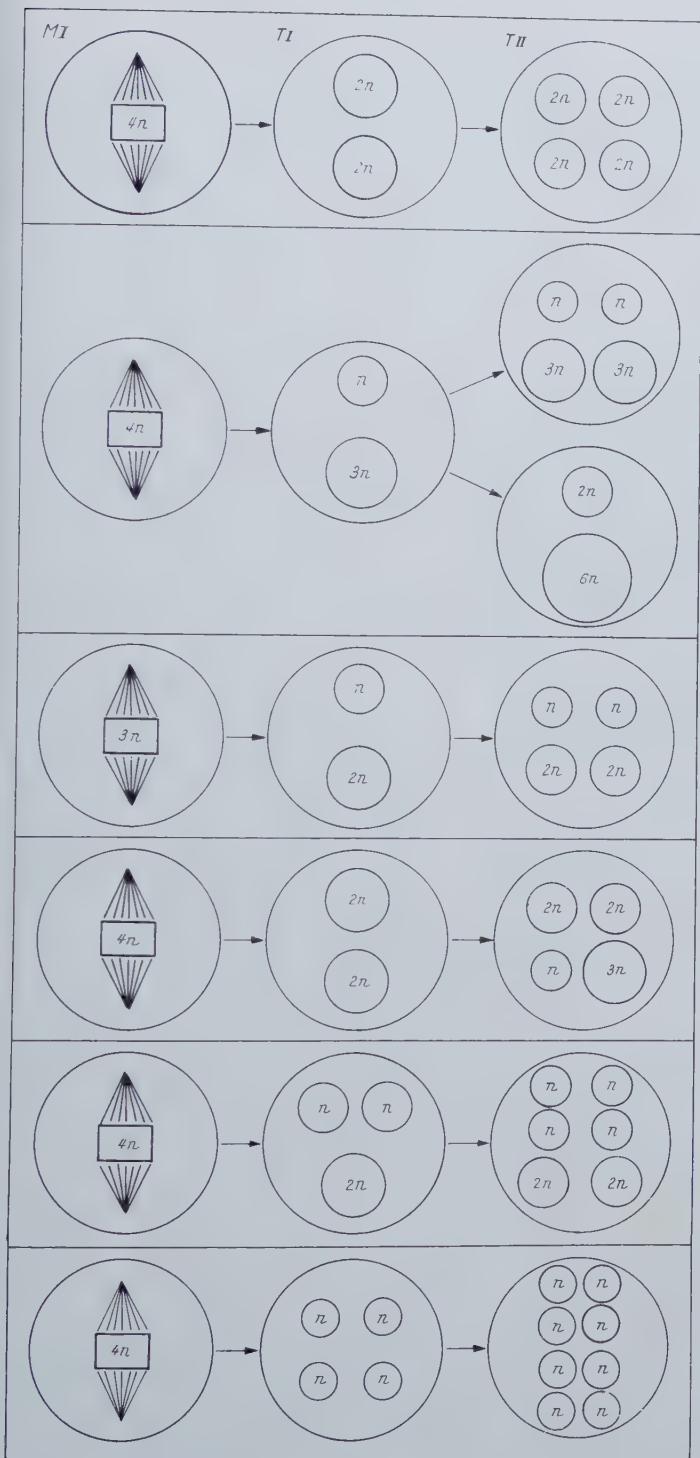
Sehr selten wurde in der 2. Metaphase schließlich noch die Bildung von 4 Äquatorialplatten mit je der haploiden Chromosomenzahl — also die Anordnung $n + n + n + n$ — beobachtet. Hier ist möglicherweise im Verlauf der 1. meiotischen Teilung eine Trennung der ursprünglich vorhandenen 48 Chromosomen in 4 selbständige Genome zustande gekommen. Läuft die Meiosis in einem derartigen Gonotokonten normal weiter, so werden 8 Genen mit der haploiden Chromosomenzahl entstehen. PMZ mit 8 etwa gleich großen Kernen im Stadium der späten 2. Telo- oder Interphase wurden vereinzelt gefunden und

könnten auf eine derartige Anordnung zurückgehen. Chromosomenzählungen waren nicht möglich.

In Abb. 10 sind in einer schematischen Darstellung alle im bearbeiteten Material gefundenen abweichenden Formen der Meiosis aufgeführt, in deren Verlauf haploide Genen gebildet werden können und die damit für das Problem der Abregulierung während des meiotischen Stadienablaufs von Interesse sind.

b) Die prämeiotische Abregulierung. Bisher sind nur Abregulierungsprozesse besprochen worden, die zeitlich während des meiotischen Stadienablaufs in tetraploiden PMZ beobachtet wurden und die damit unmittelbar zu haploiden Genen führen. In einer ganzen Reihe von Antheren wurden jedoch — meist in sehr geringer Anzahl — *inmitten tetraploider Antheren PMZ mit der diploiden oder sogar hypodiploiden Chromosomenzahl gefunden* (Abb. 11). Die Prozesse, die zu ihrer Entstehung geführt haben, müssen demnach *vor Beginn der Meiosis*, also während der prämeiotischen Mitosen, abgelaufen sein. Der Vorgang soll in der vorliegenden Arbeit daher als „prämeiotische Abregulierung“ bezeichnet werden zum Unterschied von der „mitotischen Abregulierung“ in normalen Sproß- oder Wurzelvegetationskegeln.

Aus dem prozentualen Anteil diploider PMZ an der Gesamtzahl der Gonotokonten einer tetraploiden Anthere können gewisse Rückschlüsse auf den



Normalverlauf der Meiosis einer auto-tetraploiden PMZ

Fehlverteilung von $n+3n$ in der 1. Anaphase einer tetraploiden PMZ

Fehlverteilung von $n+2n$ in der 1. Anaphase einer triploiden PMZ

Fehlverteilung von $n+3n$ aus einer Äquatorialplatte der zweiten meiotischen Teilung

Kombination von $2n+n+n$ in der 1. Telophase einer tetraploiden PMZ

Kombination von $n+n+n+n$ in der 1. Telophase einer tetraploiden PMZ

Abb. 10. Schematische Darstellung der beobachteten abnormalen Meiosen, in deren Verlauf Gonon mit der haploiden Chromosomenzahl gebildet werden (Erläuterung im Text). Die unteren beiden Regulierungsmodi kommen wahrscheinlich in Verbindung mit Spindelstörungen zustande, die in der Schemazeichnung nicht berücksichtigt wurden, weil sie im einzelnen noch nicht aufgeklärt werden konnten (Näheres im Theoretischen Teil)

Zeitpunkt der Abregulierung während der Antherenentwicklung gezogen werden. Laufen diese Prozesse in sehr frühen Stadien der Antherenentwicklung ab, so werden einige meristematische Zellen diploid werden, und alle Tochterzellen, die im Verlauf der weiteren Antherenentwicklung durch Mitosen aus diesen „Mutterzellen“ entstehen, müssen ebenfalls diploid sein. Je früher also der Regulierungsprozeß abläuft, um so größer wird die Anzahl abregulierter PMZ in der fertig ausdifferenzierten Anthere sein. Derartige Verhältnisse wurden bei einer vor 3 Jahren colchicinierten tetraploiden Tomate aufgefunden. Andererseits kann

eine sehr geringe Anzahl diploider PMZ innerhalb der tetraploiden Anthere als Beweis dafür angesehen werden, daß die Regulierungsprozesse erst sehr spät abgelaufen sind.

Im vorliegenden Material wurden nach Berücksichtigung von 9 Antheren aus 6 verschiedenen Regionen der Pflanze niemals mehr als 2 diploide PMZ je Anthere gefunden. Lediglich in einer Knospe, auf die später besonders eingegangen wird, traten höhere Raten abregulierter PMZ auf. Aus diesem geringen Anteil kann geschlossen werden, daß die Regulierungsprozesse in unserem Material knapp vor Eintritt der Archesporzellen in die Meiosis — u. U. im Verlauf der letzten prämeiotischen Mitose — stattgefunden haben. Es wurde in allen Fällen jeweils das ganze Präparat durchgemustert, dabei ist es natürlich möglich, daß nicht alle abregulierten Zellen der bearbeiteten

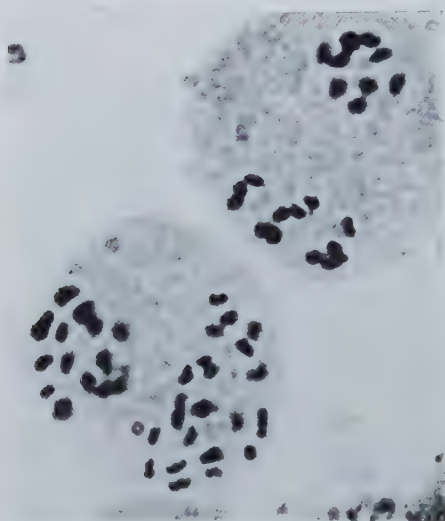


Abb. 11. Zwei benachbarte PMZ (Interkinesen) aus einer tetraploiden Anthere. Die Chromosomenzahl der unteren PMZ liegt in der Größenordnung der tetraploiden Valenz, die obere ist diploid und zeigt eine Fehlverteilung von 10+14 Chromosomen (Hauptspieß, fixiert am 18. 7. 56; 2000fach)

Antheren erfaßt worden sind. Der morphologische Unterschied zwischen einer diploiden und einer tetraploiden PMZ ist jedoch so groß, daß er auch bei einer relativ raschen Durchmusterung des Präparats ins Auge fällt. Der Anteil nicht berücksichtigter abregulierter Zellen wird also nur sehr gering sein und beeinträchtigt den oben gezogenen Schluß nicht wesentlich.

Es wäre nun wieder die Frage zu klären, ob die PMZ mit der diploiden Chromosomenzahl 2 vollständige Genome enthalten und damit wirklich in der Lage sind, nach Ablauf der Meiosis und der darauf folgenden Mitosen haploide, befruchtungsfähige männliche Gameten zu bilden. Theoretisch ließe sich diese Frage zuverlässig durch die Pachytänanalyse einer abregulierten PMZ lösen, weil die Chromosomen von *Lycopersicon esculentum* in diesem Stadium identifizierbar sind (BARTON 1950, GOTTSCHALK 1951, 1954). Leider wurde in Pachytän-Antheren keine abregulierte PMZ gefunden. Bei der Seltenheit dieses Vorgangs dürfte dieser Weg ohnehin kaum gangbar sein, denn es müßten alle Bivalente eines derartigen Kerns so übersichtlich gelagert sein, daß eine Totalanalyse der Zelle möglich wäre. Diese Voraussetzung ist bei Tomaten erfahrungsgemäß nur höchst selten erfüllt.

Die im bearbeiteten Material gefundenen niederechromosomigen PMZ durchliefen die Stadien Diakinese bis 2. Telophase. Brauchbare Schlüsse können eigentlich nur aus Diakinesekernen gezogen werden. Eine saubere prämeiotische Abregulierung müßte zu 2 vollständigen Genomen führen. Die Diakinese einer derartigen PMZ müßte also den Diakinesen diploider Organismen entsprechen, d. h. es müßten durchgängig Bivalente, bestenfalls gelegentlich einige Univalente, niemals aber Tri- oder Quadrivalente auftreten. Leider wurden zunächst nur 4 abregulierte PMZ im Stadium der Diakinese gefunden. In 2 dieser 4 Zellen waren mit Sicherheit nur Bivalente und einige Univalente vorhanden. Die anderen beiden Zellen durchliefen ein Übergangsstadium von der späten Diakinese zur Prometaphase, in welchem die Chromosomen von *L. esculentum* bereits maximal kontrahiert und die beiden Homologen eines Bivalents dicht aneinandergepreßt sind. Wenn in diesem Stadium 2 Gemini unmittelbar benachbart liegen, läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob es sich um 2 Bivalente oder um ein Quadrivalent handelt (vgl. Abb. 14). Eine Zelle im Stadium der frühen 1. Anaphase enthielt ebenfalls mit Sicherheit 12 Bivalente (Abb. 12).

Es war an der Versuchspflanze jedoch eine bisher noch nicht berücksichtigte Knospe vorhanden, die einen interessanten Beitrag zum Problem der prämeiotischen Abregulierung liefert. Die Antheren dieser Knospe enthielten reichlich Diakinesen. Hinsichtlich der Chromosomenzahlen wurden 4 verschiedene Zellgruppen ermittelt. Die überwiegende Mehrzahl aller PMZ enthielt $2n = 48$ Chromosomen, war also rein tetraploid. Daneben traten niedrigere Zahlen auf, und zwar rein diploide, hyper- und hypodiploide. Im einzelnen wurden die Chromosomenzahlen von $2n = 4$ bis $2n = 46$ gefunden, wobei die Mehrzahl der abweichenden Gonotokonten Zahlen von 30—34 aufwies (Abb. 13, 14). Nach Berücksichtigung von 68 völlig unverletzten abweichenden PMZ ergab sich folgende Verteilung:

$2n = 4$	2 PMZ	$2n = 12-16$	7 PMZ
5	1 ..	17—22	6 ..
6	2 „	24	9 „ (= 13,8%)
7	1 „	25—28	6 „
9	1 „	30—34	23 „ (= 33,8%)
		35—46	10 „

Diese Befunde entsprechen etwa den Beobachtungen, die VAARAMA (1948, 1949) an tetraploiden Wurzelspitzen-Mitosen von *Ribes* erhalten hat und die der Autor auf eine Spaltung der Spindel in Teilkomplexe zurückführt.

Während in den tetraploiden Diakinesen der oben erwähnten Antheren in durchaus normaler Häufigkeit neben Bivalenten auch Multivalente auftraten, waren in den Zellen mit diploiden, hyper- und hypodiploiden Chromosomenzahlen auffallenderweise nahezu ausschließlich Bivalente vorhanden. Dies könnte ein

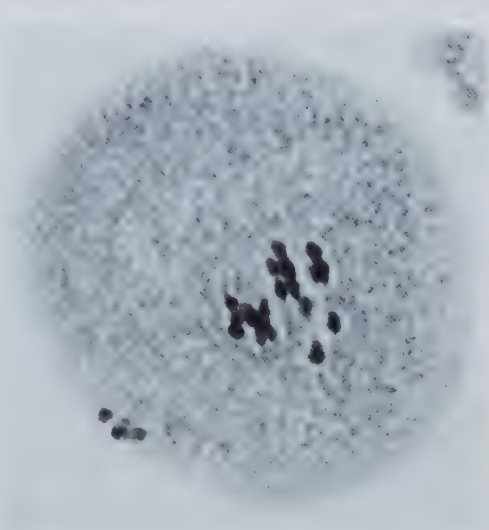


Abb. 12. Diploide PMZ (frühe 1. Anaphase) mit 12 Bivalenten aus einer tetraploiden Anthere. 2 Bivalente liegen an der Peripherie der Zelle und sind offenbar nicht mit in die Äquatorialplatte eingeordnet worden (Hauptspieß, fixiert am 22. 7. 56; 2000fach)

Hinweis darauf sein, daß bei der Bildung dieser Zellen ein gewisses Ordnungsprinzip wirksam war, das besonders deutlich in den niedrigchromosomigen PMZ in Erscheinung tritt. *Selbst in Gonotokonten mit einer Gesamtzahl von nur 4 bis 6 Chromosomen lagen diese zum überwiegenden Teil in Form von Bivalenten vor. Es hat also den Anschein, als wären die in den tetraploiden Ausgangszellen vorhandenen Vierergruppen homologer Chromosomen tatsächlich in Zweiergruppen getrennt worden.* Man kann folglich mit einer gewissen Berechtigung annehmen, daß die 24chromosomigen PMZ, die im Zuge prämeiotischer Abregulierungsvorgänge in tetraploiden Antheren entstanden sind, echte diploide Zellen mit 2 vollständigen Genomen darstellen. Ein Beweis für diese Annahme ließ sich vorerst noch nicht erbringen.

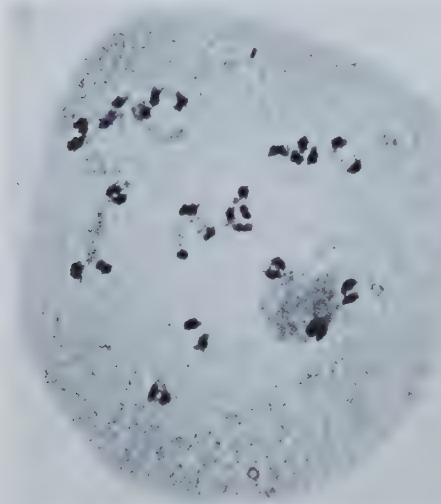


Abb. 13



Abb. 14

Abb. 13. Diakinese mit $2n=35$ Chromosomen (17 Bivalente + 1 Univalent) aus einer vorwiegend tetraploiden Anthere der Versuchspflanze (Seitensproß E 1, fixiert am 30. 12. 56; 1200fach)

Abb. 14. Prometaphase mit $2n=27$ Chromosomen aus der gleichen Anthere (1500fach)

Lediglich in einer 24chromosomigen Diakinese waren mit Sicherheit 2 Quadrivalente vorhanden. Theoretisch könnten sie durch den Ablauf von 2 reziproken Translokationen entstanden sein. Diese Annahme ist jedoch sehr unwahrscheinlich. Obgleich Translokationen bei *L. esculentum* spontan relativ häufig auftreten, ist kaum anzunehmen, daß ein derartiger Vorgang gleich zweimal im selben Kern abläuft. Man wird wohl zutreffender Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Abregulierung als Ursache annehmen können. Dies würde aber bedeuten, daß die fragliche 24chromosomige PMZ nicht diploid, sondern „pseudodiploid“ war.

Es fällt auf, daß sich die in den verschiedenen PMZ dieser Antheren vorhandenen unterschiedlichen Chromosomenzahlen zwanglos zur tetraploiden Valenz von 48 Chromosomen ergänzen lassen. Es wäre denkbar, daß die Abregulierung in einer größeren Anzahl prämeiotischer Zellen dieser Antheren fehlgeleitet worden ist. Im Zuge einer geregelten Regulierung müßten aus einer tetraploiden „Mutterzelle“ durch einen noch nicht bekannten Mechanismus 2 diploide Tochterzellen mit $24 + 24$ Chromosomen entstehen. Dieser balancierte Zustand ist jedoch nur in etwa $\frac{1}{6}$ aller regulierenden Archesporozellen dieser Antheren verwirklicht worden, während die anderen Zellen — offenbar

durch Fehlverteilungen — im Zuge dieser Prozesse die unbalancierten Kombinationen $30 + 18$, $32 - 16$, $40 + 8$ oder andere erzeugten. Darüber hinaus liegen hier noch 2 weitere interessante Effekte vor: zunächst ist die Anzahl der abweichenden Gonotokonten wesentlich höher als in den oben erwähnten 9 Antheren. Die Abregulierung ist hier also entweder zeitlich etwas früher als in den bereits beschriebenen Antheren zustande gekommen, oder es ist eine größere Anzahl von Archesporozellen davon betroffen worden. Außerdem traten die gleichen Störungstypen in verschiedenen Antheren dieser Knospe auf. *Es sind also offenbar die gleichen regulativen Vorgänge durch gleichartige Mechanismen unabhängig voneinander in verschiedenen Antheren abgelaufen.*

Es muß noch betont werden, daß eine in teilungsmechanischer Beziehung geregelte prämeiotische Abregulierung, die wirklich zur Bildung diploider PMZ führt, noch nicht genügt, um die Produktion funktionstüchtiger haploider Keimzellen zu gewährleisten. Es muß vielmehr in den abregulierten PMZ noch ein ungestörter meiotischer Stadienablauf garantiert sein, der jedoch im bearbeiteten Untersuchungsmaterial nur selten beobachtet werden konnte. Entweder



Abb. 15. Diploide PMZ aus einer tetraploiden Anthere mit einer Fehlverteilung von $(12 + 13) + (8 + 15)$ Chromosomen in der 2. Telophase (Hauptspieß, fixiert am 29. 10. 56; 1200fach)

wurden in der Prometaphase einige Bivalente nicht mit in die Äquatorialplatte einbezogen (Abb. 12), oder es kam zu Verteilungsstörungen in der 1. oder 2. Anaphase. In AI wurden Fehlverteilungen bis zu $10 + 14$ (Abb. 11), in AII sogar solche von $(12 + 13) + (8 - 15)$ gefunden (Abb. 15). Das sind Störungen, die weit außerhalb der gelegentlich auftretenden meiotischen Unregelmäßigkeiten diploider Tomaten liegen. Die aus den fraglichen Gonotokonten entstehenden Keimzellen werden nicht befruchtungsfähig sein. Es hat somit den Anschein, als sei der Abregulierungsvorgang während der Mitose mit größeren Komplikationen verbunden als während der Meiosis, er führte nach Berücksichtigung unserer Befunde in der Mitose wesentlich seltener zum Ziel. Anscheinend ist der Mechanismus dieses Prozesses so kompliziert, daß schon geringe Störungen oder Unregelmäßigkeiten untaugliche Kombinationen zur Folge haben.

In Abb. 16 sind die chromosomalen Verhältnisse der verschiedenen Regionen der Versuchspflanze in einer schematischen Darstellung wiedergegeben. Aus der Zeichnung geht hervor, in welchen Infloreszenzen Abregulierungsvorgänge beobachtet wurden und ob es sich hierbei um meiotische oder prämeiotische Regulierungen handelt. Insgesamt wurden in je 5 Infloreszenzen des Haupt- sowie des Seitensprosses 5 Regulierungsprozesse erfaßt. Es muß hinzugefügt werden, daß die Pflanze noch weitere 4 Seitensprosse besaß, an denen ebenfalls Fixierungen vorgenommen wurden. Die fixierten Antheren enthielten jedoch meiotische Entwicklungsstadien, die für derartige Untersuchungen ungeeignet sind. Durch die Ermittlung der Keimporenzahl der Pollen nach FUNKE (1956) konnte jedoch für alle Regionen nachgewiesen werden, daß ihre Chromosomenzahlen in der Größenordnung der tetraploiden Valenz lagen. Es kann also mit Sicherheit gesagt werden, daß in der Pflanze keine diploiden Sprosse vorhanden waren. Obwohl die Versuchspflanze ganz eindeutig zur Abregulierung

neigt, sind derartige Vorgänge also nicht in einem Hauptvegetationskegel der vorhandenen 10 Sprosse abgelaufen. Sie haben sich vielmehr ausschließlich erst bei der Ausdifferenzierung der Anthere — und zwar meistens kurz vor Beginn oder während der Meiosis — ereignet.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß nicht nur die Zellen mit Abregulierungserscheinungen, sondern auch PMZ mit anderen spezifischen meiotischen Störungen auffallend oft in bestimmten Bezirken der Präparate gehäuft auftraten, also wohl aus der gleichen Antherenregion stammten. Dieser Befund steht möglicherweise mit den physiologischen Ursachen des Phänomens der Abregulierung in Zusammenhang.

e) Die Häufigkeit der Regulierungsvorgänge. Einen Beitrag über die Häufigkeit von Abregulierungsvorgängen innerhalb eines Bestandes tetraploider Organismen lieferte QUADT (1955) für amphidiploide Bastarde aus *L. esculentum* × *L. pimpinellifolium*. Es wurden von 34 amphidiploiden Bastarden Linien herangezogen, die nach Ablauf von 6 Generationen zytologisch untersucht wurden. Hierbei erwiesen sich 11 dieser 34 Linien als diploid. Abregulierungsvorgänge laufen also offenbar bei Tomaten und ihren engsten Verwandten recht häufig ab. Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit lassen sich gewisse Berechnungen über die Häufigkeit der Regulierungsvorgänge innerhalb einer Anthere durchführen. Es ist kaum möglich, hierüber genaue Zahlenangaben zu machen. Exakte prozentuale Werte könnten erst errechnet werden, wenn von jeder Anthere nicht nur die regulierenden, sondern auch die normalen tetraploiden PMZ zahlenmäßig erfaßt würden. Dies ist jedoch bei *Lycopersicon esculentum* praktisch nicht durchführbar, weil die Zahlen zu hoch sind. Um einen Anhalt für derartige Berechnungen zu gewinnen, wurde die Gesamtzahl der Gonotokonten einer tetraploiden Anthere unseres Objektes ermittelt; sie lag bei etwa 7400. Es handelt sich hierbei nicht um einen geschätzten, sondern um einen gezählten Wert. Das bedeutet, daß die Blüte einer tetraploiden Tomate etwa 180000 Pollen erzeugt.

Wenn man den folgenden Berechnungen eine Zahl von 7000 PMZ je Anthere zugrunde legt, so erhält man folgende Werte: Die Anzahl der regulierenden Zellen je Anthere variierte nach Berücksichtigung von 12 Antheren, in denen überhaupt derartige Vorgänge beobachtet wurden, zwischen 1 und 96.

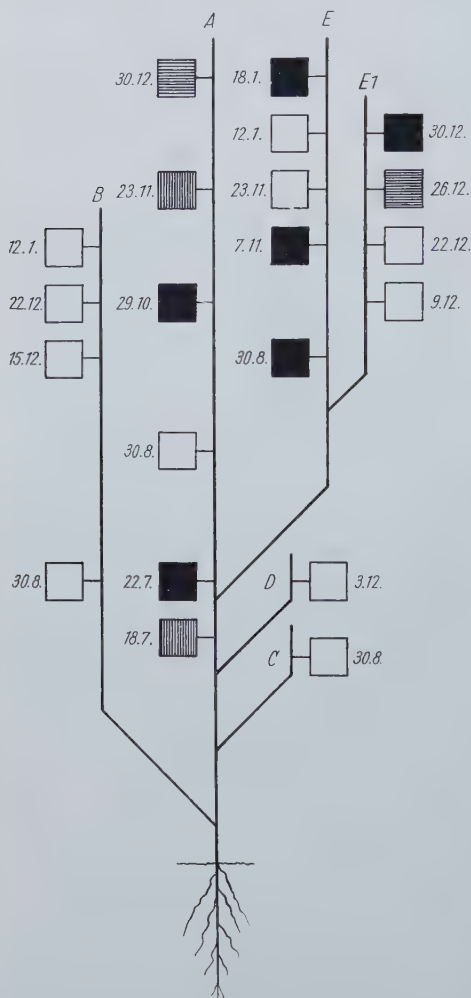


Abb. 16. Schematische Darstellung des Sproßaufbaues der Versuchspflanze Nr. 934. Die Quadrate stellen die bearbeiteten Infloreszenzen mit den Fixierungsterminen dar. Aus der Zeichnung geht hervor, in welchen Infloreszenzen Abregulierungsvorgänge beobachtet wurden und ob es sich um prämeiotische oder meiotische Regulierungen handelt. □ Keine Abregulierungen beobachtet; ▨ nur prämeiotische Abregulierungen beobachtet; ▩ nur meiotische Abregulierungen beobachtet; ■ prämeiotische und meiotische Abregulierungen beobachtet

Das entspricht einer Häufigkeit von 0,1 bis 14 $\frac{0}{00}$, also bis maximal etwa 1,5%. Hierbei sind jedoch alle Zellen berücksichtigt, in denen überhaupt regulative Vorgänge erfaßt werden konnten ohne Rücksicht darauf, ob am Ende dieser Prozesse wirklich funktionsfähige haploide Keimzellen entstehen. Der Anteil derartiger Zellen dürfte bei der bearbeiteten Pflanze ganz erheblich unter dem Maximalwert von 1,5% liegen.

Wenn in den Embryosack-Mutterzellen bzw. im Verlauf der Entwicklung der Samenanlagen die gleichen Vorgänge ablaufen wie im Androeceum, so besteht durchaus die Möglichkeit, daß die Pflanze in der Lage ist, haploide Makro- und Mikrosporen in geringer Anzahl zu bilden. Es ist damit aber zumindest theoretisch möglich, daß nach Selbstbefruchtung eine haploide Eizelle von einem haploiden spermatogenen Kern befruchtet wird, daß in der Nachkommenschaft einer derartig konstituierten tetraploiden Pflanze also in geringer Zahl diploide Individuen auftreten können. KOSTOFF und KENDALL (1935) haben beim Vergleich diploider und tetraploider Tomaten nachgewiesen, daß die Pollenschläuche der tetraploiden Organismen wesentlich dicker sind und im Griffelgewebe langsamer wachsen als die der diploiden. Es kann also damit gerechnet werden, daß in einem Gemisch diploider und haploider Pollen die haploiden Schläuche den diploiden in der Wachstumsgeschwindigkeit überlegen sind und eventuell vorhandene haploide Eizellen zeitlich vor den diploiden Schläuchen erreichen und befruchten. Die Folge davon wird ein diploider Embryo und damit eine diploide Pflanze sein.

Eine Bekräftigung dieser Annahme haben EMSWELLER und STEWART (1951) an chromosomalen Chimären von *Lilium longiflorum* erhalten. Sie fanden innerhalb der gleichen Anthere diploide und tetraploide PMZ. Da für die EMZ dieser Chimäre die gleichen abnormalen Verhältnisse anzunehmen sind, werden in den Blüten der Pflanze haploide und diploide Keimzellen gebildet werden, durch deren Befruchtung theoretisch diploide, tri- und tetraploide Zygoten zu erwarten sind. Die Nachkommenschaft der Chimäre war jedoch rein diploid. Die beiden Autoren nehmen an, daß die haploiden Keimzellen den diploiden gegenüber im Vorteil gewesen sind.

2. Sonstige meiotische Unregelmäßigkeiten der Versuchspflanze

Einen indirekten Beitrag zum Problem der Abregulierung liefern die vielgestaltigen meiotischen Störungen, die außer den Abregulierungsvorgängen in der Versuchspflanze auftraten und auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur kurz eingegangen werden soll. Relativ häufig wurden Tetradenkerne mit extrem differierenden Chromosomenzahlen gefunden, die auf starke meiotische Unregelmäßigkeiten schließen lassen. In einigen Pflanzenregionen traten in großer Zahl PMZ mit Spindelanomalien auf, deren Folge die Bildung sehr vieler (bis zu 12) Gonen je Gonotokont war (Abb. 17). Es muß hervorgehoben werden, daß die abweichend gestalteten Gonotokonten wiederum in bestimmten Bezirken der Präparate eine auffällige Anhäufung zeigten, die man direkt als „Nesterbildung“ bezeichnen könnte und die kein Zufall sein kann. Sie wurde an den PMZ mit hoher Gonenzahl ausgewertet und geht aus Tabelle 1 hervor. Die Daten dieser Tabelle wurden aus den mittleren Regionen der Präparate zweier Antheren gewonnen, in denen durch Anwendung eines nur mäßigen Druckes ein Aufplatzen der Gonotokonten verhindert wurde. Auf diese Weise konnten Gruppen zusammenliegender PMZ hinsichtlich der Anzahl ihrer Gonen ausgewertet werden. Die niedrigen Zellzahlen, aus denen sich die Nester zusammensetzen, lassen einen statistischen Vergleich der verschiedenen Antherenregionen nicht zu. Trotzdem geht aus der Tabelle wohl deutlich die Verschiedenheit der Nester hervor. So sind im 2. Nest der Anthere Nr. 4 nur normale Gonotokonten vorhanden. Im 1. Nest dieser Anthere, das immerhin aus 70 PMZ bestand, liegt der Anteil der normalen Zellen bei 87%. Im 1. Nest der Anthere Nr. 3 hingegen

überwiegen die abweichend gestalteten Gonotokonten, sie nehmen einen Anteil von reichlich 60% ein. Als Durchschnittswert für alle 9 Nester der beiden Antheren wurde nach Berücksichtigung von 286 PMZ ein Anteil von 23% Zellen mit starken Verteilungsstörungen errechnet. Im Gegensatz zu Regionen mit völlig normalem meiotischen Verhalten liegt hier also eine Pflanzenregion mit extrem abnormalen Verhältnissen vor, die sich auf einen hohen prozentualen Anteil aller vorhandenen PMZ beziehen.

Man könnte diese auffällige Nesterbildung vielleicht so interpretieren, daß man für verschiedene Bezirke dieser Antheren spezifische physiologische Bedingungen annimmt, die sekundär zu den beobachteten meiotischen Störungen führen. Ich denke hierbei etwa an eine primäre Schädigung bestimmter Teile des Tapezums, die die beobachteten Folgen in den angrenzenden Archespor- oder PMZ nach sich ziehen.

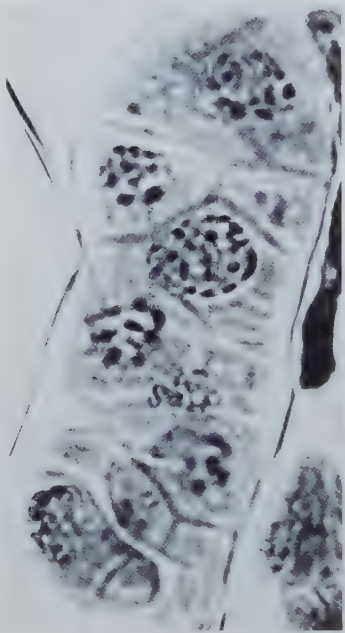


Abb. 17. Gonotokont mit 9 Gonon von unterschiedlicher Größe und Chromosomenzahl aus einer tetraploiden Anthere der Versuchspflanze (Hauptspieß, fixiert am 23. 11. 56; 1000fach)

Um die zytologische Vielfalt der bearbeiteten Versuchspflanze zu charakterisieren, müssen schließlich noch degenerative Erscheinungen angeführt werden. Es handelt sich hierbei teils um starke Verklebungen und ihre Folgen, z. T. um regelrechte Auflösungsercheinungen des gesamten chromatischen Materials im Verlauf des meiotischen Stadienablaufs. Als Endstufe dieser degenerativen Veränderung der Gonotokonten traten völlig kernlose PMZ auf. Andere Degenerationsformen standen mit dem Formwechsel des Nukleolus in Verbindung. Auch in diesem Zusammenhang verdient die Feststellung besondere Beachtung, daß die degenerierenden Zellen stets in bestimmten Zonen der Präparate auffällig gehäuft auftraten und nicht zufallsgemäß über das ganze Präparat verteilt waren. Sie entstammten offenbar in allen Fällen einer kleinen, eng begrenzten Antherenregion.

Wenn wir abschließend ein Gesamturteil über die zytologischen Verhältnisse der Pflanze Nr. 934 geben sollen, so liegt ihr Charakteristikum wohl in der Vielfalt der vom Normalverhalten einer tetraploiden Pflanze abweichenden Erscheinungen. Viele der beobachteten Unregelmäßigkeiten sind für diploide oder tetraploide

Pflanzen vereinzelt bereits beschrieben worden. Dies gilt z. B. für das Nicht-auflösen der Nukleolen, das LINNERT (1949) an *Digitalis* und GOTTSCHALK (1951) nach Röntgenbestrahlung bei *Lycopersicon esculentum* fanden. Die Verklebungen erinnern stark an die „Primäreffekte“, die nach Röntgenbestrahlung an Chromosomen auftreten (MARQUARDT 1938). Das Charakteristikum der bearbeiteten Pflanze liegt aber gerade darin, daß die vielfältigsten Abnormalitäten in verschiedenen ontogenetischen Stadien des gleichen Organismus gehäuft auftreten, daß die Pflanze in zytologischer Beziehung offenbar sehr labil ist.

Für die Beurteilung des Phänomens der Abregulierung mag es vielleicht noch von Bedeutung sein, daß gerade in denjenigen Antheren, in denen meiotische Abregulierungsvorgänge in etwas größerer Zahl auftraten, auch alle anderen meiotischen Unregelmäßigkeiten gehäuft beobachtet wurden. Andererseits waren

in einigen Pflanzenregionen völlig normale zytologische Verhältnisse realisiert; stärkere meiotische Unregelmäßigkeiten traten nicht auf, es wurden in den Antheren dieser Zonen jedoch auch niemals Abregulierungsvorgänge festgestellt. Man könnte diese Befunde in dem Sinne deuten, daß eine unmittelbare Beziehung zwischen der zytologischen Labilität bestimmter Regionen eines experimentell

Tabelle 1. Die Gonenzahl je Gonotokont in verschiedenen „Nestern“ der Antheren 3 und 4 einer am 23. 11. fixierten Knospe des Hauptsprosses (Erläuterungen im Text)

Anthere Nr.	Nest Nr.	Normale PZM				Ges.- Zahl der norm. PMZ	%	Abweichende PMZ								Ges.- Zahl der abw. PMZ	%	Ges.-Zahl der PMZ des Nestes
		4	4-	1	4			2	3	5	6	7	8	9	11			
3	1	8	2	1		11	39,3	1	3	4	3	2	3	1	17	60,7	28	
	2	10	2		12	—		—	1	1	1	—	—	3	15			
	3	6	1	—	7	—		2	1	5	1	—	—	9	16			
	4	7	2	3	12	—		—	2	—	—	—	—	2	14			
	5	31	8	1		40	75,5	—	6	3	2	1	1	—	13	24,5	53	
4	1	52	8	1		61	87,1	—	3	1	2	3	—	—	9	12,9	70	
	2	30	1		31	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—			31
	3	21	3	—	24	—	3	1	1	1	—	1	7	31				
	4	19	3	—	22	—	2	2	2	—	—	—	6	28				
Summe		184	30	6		220	76,9	1	19	15	16	9	4	2	66	23,1	286	

hergestellten tetraploiden Organismus und dem Auftreten von Regulierungsprozessen besteht. Möglicherweise ist diese Labilität überhaupt die Voraussetzung für den Ablauf derartiger Vorgänge.

D. Theoretischer Teil

Das Kernproblem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in polyploiden Organismen besteht darin, daß irgendwann im Verlauf der Ontogenese in meristematischen Geweben aus polyploiden Mutterzellen diploide Tochterzellen entstehen. Im Prinzip läuft ein derartiger Vorgang in Verbindung mit der sexuellen Fortpflanzung in jedem Organismus planmäßig bei der Keimzellenbildung ab, denn einer der Effekte der Meiosis liegt ja in der Reduktion der Chromosomenzahl auf die Hälfte. Von einer Abregulierung kann man aber erst dann sprechen, wenn diese Reduktion der Chromosomenzahl im Soma zustande kommt oder aber wenn die Meiosis eines tetraploiden Organismus in der Weise abläuft, daß nicht diploide, sondern haploide Keimzellen entstehen.

Es sei zunächst näher auf die „somatische Reduktion“ eingegangen, die seit den klassischen Arbeiten von HUSKINS u. Mitarb. nach der Einwirkung bestimmter Chemikalien wie Nukleinsäuren und Antibiotika, nach Kälteeinwirkung, aber auch in unbehandelten Kontrollen von vielen Autoren an *Wurzelspitzen-Mitosen* der verschiedensten Objekte beobachtet wurde. Aus der Fülle der auf diesem Gebiet bereits publizierten Arbeiten seien genannt: BATTAGLIA (1947), HUSKINS (1948a, b, c), HUSKINS und STEINITZ (1948), HUSKINS und CHENG (1950), HUSKINS und CHOUINARD (1950), VAARAMA (1948, 1949), KODANI (1948), WILSON und CHENG (1949), WILSON (1950), PÄTAU (1950), PÄTAU und PATIL (1951), FRANZKE und

ROSS (1952), SHARMA und SEN (1954), BRITTON und HULL (1957). Die entsprechende Erscheinung trat offenbar auch in der Meiosis von *Triticum* $\times$ *Agropyrum*-Bastarden auf (GAUL 1953).

Der übereinstimmende Befund aller dieser Untersuchungen liegt darin, daß in der Prophase von Wurzelspitzen-Mitosen innerhalb der Zelle zwei getrennte Chromosomenpartien auftreten, die selbständige Äquatorialplatten mit eigenen Spindeln bilden können. Die Vorgänge werden von VAARAMA (1948, 1949) auf eine Teilung der Spindel in 2 voneinander unabhängige Teilkomplexe zurückgeführt. *Sehr häufig sind nun die Chromosomenzahlen der beiden Parteien völlig oder annähernd gleich und entsprechen der reduzierten Chromosomenzahl des betreffenden Organismus.* Das Phänomen ist unter dem Terminus „reductional groupings“ in die Literatur eingegangen und wird gelegentlich auch als „somatische Meiosis“ bezeichnet. Wenn ein Zusammenhang dieses Phänomens mit echten meiotischen Vorgängen auch sehr umstritten ist, so können doch nach Beendigung der Mitose in einer derartigen Zelle Tochterkerne mit der reduzierten Chromosomenzahl entstehen, es kann also durch die Bildung von reductional groupings einer der 3 Effekte der Meiosis erreicht werden.

Es ist dabei prinzipiell ohne Bedeutung, daß die Mehrzahl dieser Vorgänge an Wurzelspitzen-Mitosen *diploider* Organismen beobachtet wurde und damit nicht unmittelbar mit dem Phänomen der Herabregulierung der Chromosomenzahl in polyploiden Organismen in Verbindung steht. Entscheidend ist zunächst nur, daß die Gesamtzahl der im Kern vorhandenen Chromosomen in 2 gleich große Parteien mit je der halben Chromosomenzahl der Mutterzelle aufgeteilt wird. Von größter Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob die beiden getrennten Parteien nur zufällig die reduzierte Chromosomenzahl enthalten oder ob sie je ein vollständiges Genom darstellen. Es ist sehr schwierig, diese Frage zuverlässig zu beantworten, weil hierfür eine Identifizierung der Chromosomen der beiden Gruppen notwendig ist, die sich bei der Mehrzahl der bearbeiteten Objekte nicht durchführen ließ.

Nach Untersuchungen von WILSON und CHENG (1949) an *Trillium*, dessen Chromosomen identifizierbar sind, scheint in Verbindung mit der somatischen Reduktion tatsächlich eine Trennung der beiden Genome angestrebt zu werden. PÄTAU (1950) vertritt nach Bearbeitung von *Rhoeo* und *Allium* den Standpunkt, daß das Phänomen als solches wohl durch zufällige mitotische Unregelmäßigkeiten entsteht, hält es aber für sehr wahrscheinlich, daß nur diejenigen Zellen erhalten bleiben, deren Chromosomenpartien ein $\pm$ vollständiges Genom darstellen. Schließlich müssen in diesem Zusammenhang noch die Befunde von GLÄSS (1956a, b) an diploiden und polyploiden Mitosen der Rattenleber genannt werden. Der Autor hat eine Identifizierung der Chromosomen seines Objektes vorgenommen und hat festgestellt, daß die beobachteten Aufgliederungen der Kerne seines Materials in Form von „Genomsonderungen“ abzulaufen scheinen. Die in der Pro-, Meta- und Anaphase gelegentlich auftretenden isolierten Chromosomengruppen entsprechen offenbar nicht nur zahlenmäßig, sondern auch hinsichtlich ihres zytologischen und genetischen Wertes vollständigen Genomen.

Zu den gleichen Schlußfolgerungen sind auch wir nach Bearbeitung der prämeiotischen Abregulierungsvorgänge unseres tetraploiden Materials gekommen. Wenn auch eine Identifizierung der Chromosomen in diesem Falle nicht möglich war, so lassen sich doch aus dem Paarungsverhalten der Chromosomen in der nachfolgenden Meiosis gewisse Schlüsse ziehen. Wenn die Prozesse, die im Soma eines tetraploiden Organismus zu einer Verminderung der Chromosomenzahlen führen, rein zufällig und ohne Berücksichtigung der genomatischen Verhältnisse

ablaufen, so wird es dem Zufall überlassen bleiben, wieviele der ursprünglich vorhandenen 4 Homologen eines jeden Chromosomentypus in die niedrigchromosomigen Kerne gelangen. Es wird dabei wohl häufig eine Trennung von $2 + 2$ zustande kommen, es sind aber ebensogut die Kombinationen $1 + 3$ und $0 + 4$ denkbar. Treten derartige „reduzierte“ Zellen später in die Meiosis ein, so kann eine normale Bivalentenbildung nur ablaufen, wenn bei den vorausgegangenen reduzierenden Prozessen eine Trennung der 4 Homologen in 2 Zweiergruppen vollzogen worden ist. Das Paarungsverhalten der Chromosomen in der Diakinese abregulierter PMZ gibt also gewisse Hinweise auf den Ablauf der prämeiotischen Regulierung. Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß in den Diakinesen der abregulierten PMZ unseres tetraploiden Materials nahezu ausschließlich normale Bivalente und keine Multivalente auftraten (vgl. S. 64). Es sind also im Verlauf der prämeiotischen Abregulierung Zellen mit Zweiergruppen homologer Chromosomen aus ursprünglich tetraploiden Zellen entstanden. Prinzipiell entspricht dieser Vorgang einer Genomsonderung.

Es sei betont, daß in nahezu allen Arbeiten, die sich mit dem Problem der somatischen Reduktion beschäftigen, auch Abweichungen von den theoretisch zu erwartenden Chromosomenzahlen erwähnt werden. Ohne Zweifel läuft die Trennung eines Chromosomensatzes in 2 Partien nicht in allen Fällen gesetzmäßig ab. Das mag vor allem für diploide Zellen gelten (WILSON und CHENG 1949). Das Auftreten von Unregelmäßigkeiten spricht m. E. jedoch nicht generell gegen die oben vertretene Ansicht. Bei der Bearbeitung der prämeiotischen Abregulierung traten in den tetraploiden Antheren unseres Materials neben rein diploiden PMZ auch stark hypodiploide auf. In der Diakinese dieser Zellen waren nun ebenfalls ausschließlich normale Bivalente vorhanden. *Es ist also offenbar auch in den Zellen, in denen der Prozeß der Abregulierung nicht funktioniert hat, eine Trennung der 4 Homologen der tetraploiden „Mutterzelle“ in 2 Gruppen von je zwei Homologen vollzogen worden.* Dieser an prämeiotischen Mitosen erhaltene Befund ist m. E. im Sinne einer wirklichen Genomsonderung zu deuten.

Schon HUSKINS (1949) und VAARAMA (1949) haben im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen an Wurzelspitzen darauf hingewiesen, welch eine wichtige Rolle derartige Vorgänge in Verbindung mit der Abregulierung bei polyploiden Organismen spielen könnten. Wenn durch eine somatische Reduktion aus tetraploiden Zellen diploide entstehen, so ist die Bildung haploider Keimzellen prinzipiell möglich, wenn die bereits reduzierten somatischen Zellen durch den Ablauf einer normalen Meiosis eine 2. Reduktion erfahren. Tatsächlich haben VAARAMA (1948, 1949), HUSKINS und CHOUINARD (1950), FRANZKE und ROSS (1952), SHARMA und SEN (1954) sowie BRITTON und HULL (1957) die Bildung von reductional groupings nicht nur in diploiden, sondern auch in *polyploiden* Wurzelspitzen-Mitosen beobachtet. Das gleiche gilt für die Befunde von GLÄSS (1956) an polyploiden Mitosen in der Rattenleber. Es ist anzunehmen, daß derartige Vorgänge auch in anderen Meristemen polyploider Organismen spontan ablaufen. Von besonderer Bedeutung dürften in diesem Zusammenhang die jungen meristematischen Antheren vor Eintritt der Archesporenzellen in die Meiosis sein. Wenn hier derartige Vorgänge zustande kommen, so besteht die Möglichkeit der Bildung diploider PMZ, die nach Ablauf einer normalen Meiosis zu haploiden Keimzellen führen müßten. Derartige Vorgänge konnten in unserem

tetraploiden Material unmittelbar beobachtet werden: es waren innerhalb tetraploider Antheren in geringer Anzahl diploide PMZ vorhanden, es war also im Verlauf der prämeiotischen Mitosen durch bisher noch unbekannte Mechanismen bereits eine Reduktion der Chromosomenzahl erfolgt. Es konnte nicht festgestellt werden, ob diese Reduktion in Verbindung mit der Entstehung von reductional groupings abgelaufen war. Auf jeden Fall traten die fraglichen diploiden PMZ in die Meiosis ein und produzierten Gonen mit der haploiden Chromosomenzahl.

Die in den Wurzelspitzen beobachtete somatische Reduktion könnte — wenn sie in jungen tetraploiden Antheren abläuft — unter 3 Voraussetzungen unmittelbar mit dem Abregulierungsproblem in Verbindung stehen:

1. Die Vorgänge müßten wirklich zu einer Trennung kompletter Genome führen. Diese Annahme kann noch nicht als endgültig bewiesen gelten.

2. Die Genomsonderung dürfte sich nicht auf die Kerne beschränken, es müßten vielmehr anschließend Zellteilungen folgen. Es müßten also die beiden aus einer tetraploiden „Mutterzelle“ neu entstandenen diploiden Kerne mit einer Portion Zytoplasma durch eine Membran voneinander getrennt und damit zu selbständigen Zellen werden.

Soweit ich die Literatur überblicke, sind Membranbildungen im Zusammenhang mit reductional groupings noch nicht unmittelbar beobachtet worden. Es ist immer nur von Kernen, nicht aber von Zellen die Rede. LEVAN (1939) hat jedoch nach Einwirkung von Colchicin auf die Meiosis von *Allium cernuum* Monaden mit der tetraploiden Chromosomenzahl erhalten. In der Pollenmitose dieser Monaden traten relativ häufig multipolare Teilungen auf, die in der Anaphase zu 3 Chromosomengruppen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen führten. Hierbei wurden Kombinationen beobachtet, die zahlenmäßig dem Verhältnis von $2n + (n + 1) + (n - 1)$ entsprachen. Im Anschluß an diese Vorgänge wurden die 3 Chromosomengruppen durch Membranen voneinander getrennt. Ähnliche Befunde erhielt LEVAN (1938) an den Kernen hochpolyploider Wurzelspitzen. Im Zuge der Rückkehr von der C-Mitose zu normalen Mitosen entstand eine multipolare Spindel; die Chromosomen des hochpolyploiden Kerns wurden in viele Gruppen aufgeteilt, die nach Ablauf der Telophase durch Zellwände voneinander getrennt wurden. Die Riesenzelle wurde dadurch in eine größere Anzahl kleiner Zellen aufgeteilt. Durch diesen Vorgang wird — ohne Berücksichtigung der genomatischen Verhältnisse — zumindest zahlenmäßig in somatischen Zellen eine Reduktion der Chromosomenzahl erreicht.

3. Die Teilungsfähigkeit der reduzierten Zellen müßte erhalten bleiben.

Auch diese Annahme kann noch nicht als geklärt betrachtet werden. Unsere Untersuchungen beweisen zwar, daß die Teilungsfähigkeit meristematischer Zellen nach Ablauf prämeiotischer Reduktionsvorgänge erhalten bleiben kann, denn zumindest ein Teil dieser Zellen trat in die Meiosis ein. Andererseits wurden in allen Antheren, in denen Abregulierungsvorgänge abgelaufen waren, auch regelmäßig Degenerationserscheinungen in vielen PMZ beobachtet. Ganz ähnliche Befunde haben VAARAMA und andere Autoren in denjenigen Wurzelspitzen erhalten, in denen reductional groupings auftraten. Es muß also damit gerechnet werden, daß zumindest ein Teil der zytologisch abnormalen Zellen im Zuge dieser Vorgänge zugrunde geht oder doch die veränderten karyologischen Verhältnisse nicht auf Tochterzellen überträgt.

Es sei darauf hingewiesen, daß die mitotische und prämeiotische Abregulierung theoretisch auch noch auf einem anderen, weniger komplizierten Weg erreicht werden könnte. Es wäre denkbar, daß in einer oder einigen Archesporzellen *vorzeitig* diejenigen zell- oder kernphysiologischen Bedingungen realisiert werden, die für den Umschlag von Mitose auf Meiosis verantwortlich sind, so daß diese Zellen eine reguläre Meiosis oder die für die vorliegende Fragestellung entscheidende 1. meiotische Teilung eingehen. Es würden dann nach einer regulären Bivalenten-

bildung Tochterkerne mit der *reduzierten und einregulierten diploiden Chromosomenzahl* entstehen, die später — gemeinsam mit allen anderen Archesporzellen der Anthere — eine zweite Meiosis durchlaufen und haploide Keimzellen hervorbringen. Dieser Vorgang könnte theoretisch sowohl in frühen Stadien der Antherenentwicklung (also im Verlauf der prämeiotischen Mitosen) wie auch in normalen Sproßvegetationskegeln ablaufen und würde zu einregulierten diploiden Zellen und später zu diploiden Organen führen (Abb. 18).

In diesem Zusammenhang müssen die von STEIN (1936) an ihrer „caneroidea“-Mutante von *Antirrhinum* erhaltenen Befunde diskutiert werden. In den Blütenregionen dieser Mutante treten polyploide Bezirke auf, in denen vereinzelt „Reduktions-Mitosen“ ablaufen. Sie sind durch Paarungstendenzen der Chromosomen in der Prophase gekennzeichnet. Es entstehen dadurch in der Prometaphase Vierergruppen von Spalthälften, die an die Geminibildung der meiotischen Prophase erinnern, aber offenbar anders zustande gekommen sind.

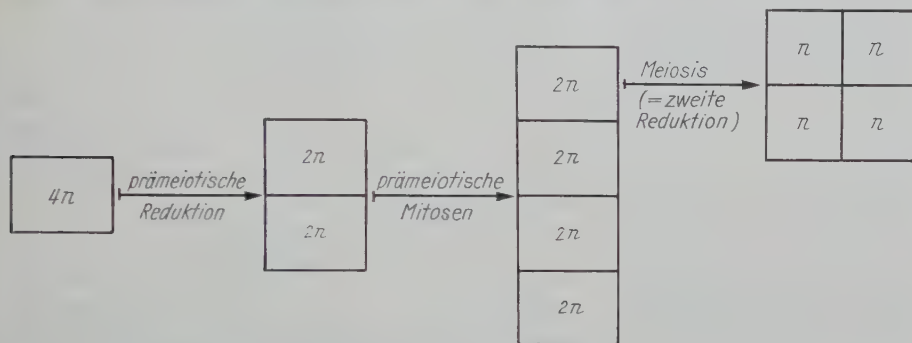


Abb. 18. Schematische Darstellung der Entstehung haploider Gonen aus tetraploiden Archesporzellen durch zweimalige Reduktion der Chromosomenzahl

In der Anaphase dieser abweichenden Mitosen werden nicht Spalthälften, sondern ganze Chromosomen an die Pole verteilt, es erfolgt also im Verlauf einer Mitose eine Reduktion der Chromosomenzahl auf die Hälfte. Die Autorin nimmt an, daß ein großer Teil der zur Befruchtung gelangenden Pollen der Mutante aus Archesporzellen hervorgeht, die eine derartige Reduktions-Mitose durchlaufen haben. Es könnte sich bei dieser abweichenden Form der Mitose also im Prinzip um Vorgänge handeln, die der oben formulierten Hypothese entsprechen. Leider konnte der in diesem Zusammenhang wichtigste Punkt offenbar nicht geklärt werden: es werden keine Aussagen darüber gemacht, ob die Paarung während der Prophase der Reduktions-Mitose grundsätzlich zwischen homologen Chromosomen erfolgt. Ließe sich dies eindeutig beweisen, so wären mit der zahlenmäßigen Reduktion auch geordnete genomatische Verhältnisse verbunden und es läge ein klarer Fall prämeiotischer Abregulierung vor. Schließlich sei noch erwähnt, daß die doppelte Reduktion der Chromosomenzahl offenbar auch *nach* der Meiosis erfolgen kann. DE REZENDE-PINTO und DE LEMOS-PEREIRA (1950) haben bei *Dryopteris filix mas* in einer „dritten meiotischen Teilung“ eine nochmalige Herabsetzung der Chromosomenzahl beobachtet.

Im folgenden soll nun näher auf die Abregulierungsvorgänge *während der Meiosis* eingegangen werden. Die Deutung der erhaltenen Befunde bereitet insofern große Schwierigkeiten, als die beobachteten Regulierungsmechanismen sehr unerwarteter Natur sind. Eine bessere Beurteilung der Vorgänge wird erst möglich sein, wenn ein wesentlich umfangreicheres empirisches Material vorliegt. Es sollen daher im Rahmen dieser Veröffentlichung nur einige Arbeitshypothesen aufgestellt werden, die als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen sollen.

Es handelt sich im wesentlichen um 2 Mechanismen, nämlich um die Chromosomenverteilung von $n + 3n$ in der 1. meiotischen Anaphase und um die Kombination von $2n + n + n$ in der 1. Telo- bzw. 2. Metaphase. Im empirischen Teil wurde bereits dargelegt, daß die Vorgänge außerhalb von Zufallserscheinungen liegen und daß mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, daß die im Verlauf dieser Prozesse entstehenden Keimzellen mit der haploiden Chromosomenzahl wirklich ein vollständiges Genom enthalten und damit in der Lage sind, nach Befruchtung gleichgestalteter Eizellen einen diploiden Organismus zu bilden. Damit wäre eine Erklärung für den Ablauf des Phänomens der Abregulierung gefunden, wenn auch der endgültige Beweis für die eben formulierte Annahme noch aussteht.

Die Zerlegung eines polyploiden Kerns in 2 Chromosomenpartien mit unterschiedlicher Valenz wurde bereits von SUOMALAINEN (1940) an der Reifeteilung polyploider parthenogenetischer *Curculioniden* beobachtet. Diese Rüsselkäfer durchlaufen nur eine Reifeteilung. Bei der tetraploiden Art *Otiorrhynchus dubius* traten neben normalen Eiern auch solche auf, in denen in der Metaphase die vorhandenen Chromosomen in 2 oder 3 Teilplatten angeordnet waren. Hierbei wurden die Kombinationen $n + 3n$, $2n + 2n$ und $2n + n + n$ beobachtet. Ähnliche Verhältnisse waren auch bei der triploiden Art *O. ligustici* realisiert. Aus der Form der Chromosomen schloß SUOMALAINEN, daß es sich bei den verschiedenen Gruppen um einzelne Genome handeln könne. Ganz entsprechende Befunde erhielten HUSKINS und CHOUINARD (1950) sowie GLÄSS (1956a, b) an tetra- und triploiden *Mitosen*.

Die Anordnung von $2n + n + n$ in der mitotischen oder 1. meiotischen *Metaphase* kann jedoch nicht unbedingt mit der gleichen Anordnung in der mitotischen oder 1. meiotischen *Telophase* gleichgesetzt werden. Im ersteren Falle müssen die Prozesse, die zu den abweichenden karyologischen Verhältnissen geführt haben, in der Prophase der betreffenden Kerne oder noch früher abgelaufen sein. Im zweiten Fall können darüber hinaus noch Spindelanomalien für das Zustandekommen der abweichenden Bilder verantwortlich gemacht werden. So beschreibt WOLL (1953) nach Einwirkung von Nukleinsäuren auf Wurzelspitzen-Mitosen von *Vicia faba* eine tripolare *Anaphase*, die zahlenmäßig der Kombination von $2n + n + n$ entspricht; es war jedoch nicht feststellbar, ob eine Trennung vollständiger Genome erfolgt war. Diese Beobachtung scheint noch am ehesten unseren Befunden in der 1. meiotischen Telo- bzw. der 2. Metaphase zu entsprechen. Es müßte jetzt geklärt werden, wie dieser abweichende Prozeß teilungsmechanisch abläuft. Ich möchte hierzu folgende Arbeitshypothese anführen, die jedoch noch nicht durch klare empirische Befunde gestützt werden kann:

Die Entstehung von 3 statt 2 Tochterkernen nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung steht offenbar mit einer abweichend gestalteten Spindel in Verbindung. Eine Deutungsmöglichkeit für die in TI und MII beobachteten Befunde ist in Abb. 19 schematisch dargestellt. Es wäre denkbar, daß die Trennung der Genome bereits gegen Ende der 1. meiotischen Prophase, und zwar bei der Einordnung der Bivalente in die Äquatorialebene beginnt und daß 2 lagemäßig unmittelbar benachbarte, aber funktionell bereits selbständige Platten entstehen. Möglicherweise ist den beiden Platten zunächst nur eine gemeinsame Spindel zugeordnet. Im Verlauf der Anaphasenwanderung der Chromosomen kommt eine Spaltung der Spindel zustande, die nach Vollzug der Anaphasenwanderung in der 1. Telophase zu 4 Tochterkernen mit stark verminderten Chromosomenzahlen — im Idealfall mit je der haploiden Zahl — führen müßte (Abb. 19 b, c). Läuft in einem

derartigen Gonotokonten die Meiosis normal weiter, so werden nach ihrer Beendigung 8 haploide Gonen vorhanden sein. Derartige Bilder wurden gefunden, wenn auch in sehr geringer Anzahl. Wesentlich häufiger traten drei statt der eben beschriebenen 4 Tochterkerne in *TI* oder *MII* auf. Sie könnten durch eine unvollständige Spaltung der Spindel entstehen, wie sie in Abb. 19f dargestellt ist. Als Hinweis auf die Brauchbarkeit dieser Hypothese kann die in fast allen Zellen beobachtete Tatsache angesehen werden, daß die beiden Kerne mit der haploiden Chromosomenzahl in *TI* stets ganz dicht benachbart lagen und dadurch lagemäßig gemeinsam einem der beiden ursprünglichen Spindelpole entsprechen. In der-

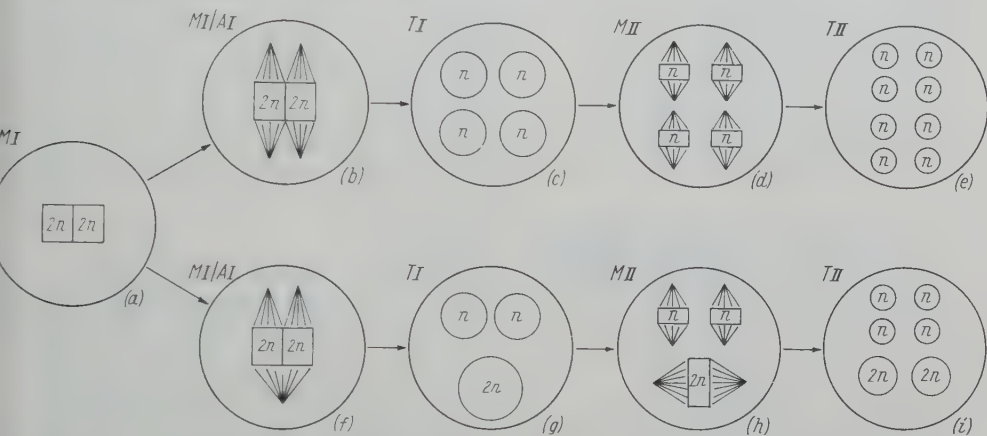


Abb. 19. Die Deutung des Abregulierungsmodus $2n + n + n$ in der Meiosis (Erläuterung im Text)

artig gestörten PMZ werden nach Ablauf der Meiosis 6 Gonen, und zwar 4 haploide und 2 diploide, entstehen. Derartige Gonotokonten wurden im bearbeiteten Material in großer Zahl gefunden.

Im Zuge einer unvollständigen Spindelspaltung könnten sehr leicht die vielfach beobachteten Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenzahl der beiden benachbarten Kerne zustande kommen. Es ist gut vorstellbar, daß die Spaltung nicht in allen Fällen in der Weise ablaufen wird, daß genau 2 vollständige Genome entstehen. Schon geringe Störungen könnten vielmehr zur Kombination von $(n-1) + (n+1)$ oder zu noch stärker vom balancierten Zustand abweichenden Kombinationen führen (Abb. 20). Im bearbeiteten Material wurden 2 PMZ im Stadium der 1. Telophase gefunden, deren Spindelfigur den Abb. 19f und 20 entsprach. Leider war die Spindel so schwach gefärbt, daß sie nicht als photographischer Beleg für die eben formulierte Hypothese verwendet werden kann.

Man könnte den beobachteten Vorgängen auch — unter Umgehung der Annahme einer Spindelspaltung — das Auftreten tetra- bzw. tripolarer Spindeln zugrunde legen. Es muß hierzu jedoch bemerkt werden, daß im Zuge der Bearbeitung der somatischen Reduktion, die offenbar teilungsmechanisch in einem gewissen Zusammenhang mit den von uns beobachteten Vorgängen in der Meiosis steht, noch keine multipolaren Spindeln beobachtet worden sind. Außerdem sollte man erwarten, daß die 3 Pole einer tripolaren Spindel innerhalb der Zelle etwa gleich weit voneinander entfernt liegen und zusammen mit den Chromosomen eine etwa symmetrische Teilungsfigur bilden (vgl. die multipolaren Spindeln, die THERMAN und TIMONEN (1950) sowie andere Autoren beschrieben). Derartige Figuren wurden jedoch in unserem Material nicht gefunden. Wie bereits erwähnt wurde, haben wir von der abregulie-

renden Pflanze auf vegetativem Wege 9 Nachkommen erhalten, in denen — soweit sie bereits zytologisch bearbeitet worden sind — die gleichen Abregulierungserscheinungen auftreten wie in der Mutterpflanze. Es besteht somit die Möglichkeit, durch Verarbeitung eines umfangreichen Antherenmaterials die Spindelbildung in derartigen PMZ zu studieren und eine Beantwortung dieser Fragestellung anzustreben.

Nach den beiden eben formulierten Interpretationen ist der entscheidende Prozeß dieses Regulierungsmodus die Trennung der 4 vorhandenen Genome in 2 Partien zu je 2 Chromosomensätzen im Verlauf der späten meiotischen Prophase. Es liegen bisher noch keine sicheren empirischen Befunde vor, mit deren

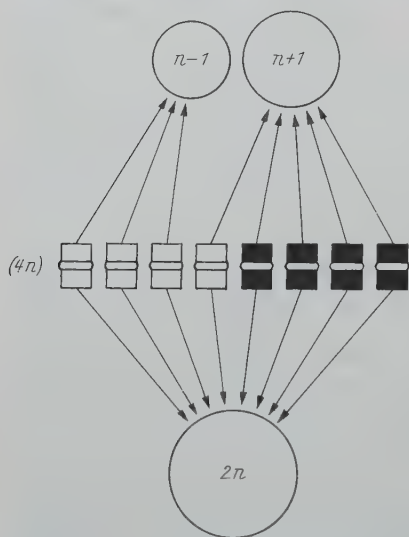


Abb. 20. Deutung des Zustandekommens von Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenzahl der beiden haploiden Kerne des Abregulierungsmodus $2n + n + n$ in der 1. Telophase (Erläuterung im Text). Es bedeuten: weiß: die Genome $A1 + A2$, schwarz: die Genome $A3 + A4$ der Äquatorialplatte einer autotetraploiden PMZ

Hilfe man den Ablauf dieses Prozesses erklären könnte. In der Diakinese und 1. Metaphase wurden wohl vereinzelt Fälle beobachtet, in denen die vorhandenen 48 Chromosomen in Form von 2 Partien zu je 24 Chromosomen — und zwar 12 Bivalenten — auftraten. Die wenigen Befunde können jedoch noch nicht als Bestätigung der oben formulierten Arbeitshypothese herangezogen werden, sie könnten ebenso gut Zufallserscheinungen sein. Es wäre jedoch denkbar, daß sich diese Frage an Pflanzen, in denen die Abregulierungsvorgänge in größerer Häufigkeit auftreten, statistisch bearbeiten und damit vielleicht klären lassen.

Es wurde schon mehrfach erwähnt, daß inmitten der bearbeiteten tetraploiden Antheren gelegentlich triploide PMZ auftraten. Sie zeigten in der 1. Anaphase ausnahmslos eine Verteilung von $n+2n$ und erhärten damit die Annahme, daß diese Fehlverteilung (wie auch die Verteilung von $n+3n$ in tetraploiden PMZ) gesetzmäßig erfolgt. Es wäre nun noch das Zustandekommen der triploiden PMZ zu diskutieren. In der Metaphase tetraploider Wurzelspitzen-Mitosen von *Rhoeo discolor* haben HUSKINS und CHOUINARD (1950) die Anordnung von $n+3n$ mehrfach beobachtet; die gleichen Befunde erhielt GLÄSS (1956) an tetraploiden Mitosen der Rattenleber. Wenn die Mitose in einer derartigen Zelle normal weiterläuft, werden 2 Spindeln mit 4 Tochterkernen entstehen, von denen 2 die haploide und 2 die triploide Chromosomenzahl besitzen. Werden nun die einzelnen Kerne nach Abschluß der Mitose durch Membranen voneinander getrennt, so könnten auf diesem Wege triploide somatische Zellen entstehen. Das Zustandekommen triploider PMZ in einer tetraploiden Anthere ist auf die gleiche Weise erklärbar, wenn die eben beschriebenen Prozesse während der prämeiotischen Mitosen ablaufen.

Es kann noch nicht endgültig beurteilt werden, ob man die im empirischen Teil der Arbeit beschriebenen Befunde verallgemeinern kann. Im vorliegenden Falle ist lediglich der Versuch gemacht worden, die an einem günstigen Objekt gegebenen Verhältnisse zu analysieren. Es ist durchaus denkbar, daß bei anderen Individuen der Species *Lycopersicon esculentum* und bei anderen Arten vor allem hinsichtlich des Zeitpunktes der Abregulierung und der Menge abregulierter Zellen

andere Verhältnisse vorliegen. So hat SCHWANITZ (brieflich) kürzlich bei oktaploiden Pflanzen von *Bryophyllum Daigremontianum* in ganzen Pikierkästen eine Herabregulierung zur diploiden Phase beobachten können: ähnliche Befunde erhielt er an tetraploiden Individuen von *Atropa belladonna*. Die Ursachen dieser Massenregulierung sowie ihre zytologischen Mechanismen konnten nicht aufgeklärt werden. Es muß hervorgehoben werden, daß die in unserem tetraploiden Material beobachteten Regulierungsvorgänge nicht nur in verschiedenen Regionen der Versuchspflanze und zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Ontogenese auftraten, sondern daß sie schon vor 3 Jahren an einer rein tetraploiden Tomate gefunden wurden. Es liegt somit die Annahme nahe, daß die beschriebenen Mechanismen der meiotischen Abregulierung wohl von allgemeiner Gültigkeit sein dürften. Damit soll nicht gesagt sein, daß der gleiche Effekt nicht auch noch auf anderen Wegen erreicht werden kann. Beim gegenwärtigen Stand der Bearbeitung dieses Problems ist es zunächst notwendig, ein möglichst umfangreiches empirisches Material zu sammeln, um die Vorgänge noch besser beurteilen zu können.

Zusammenfassung

1. Eine etwa tetraploide Versuchspflanze von *Lycopersicon esculentum* mit $2n = 45-53$ Chromosomen erwies sich als cytologisch instabil und zeigte in verschiedenen Infloreszenzen von Haupt- und Seitensprossen unterschiedliche Chromosomenzahlen.

2. Im Verlauf der Meiosis wurden in tetraploiden PMZ zwei abweichende Teilungsmechanismen gefunden, die zur Bildung von Gonen mit der haploiden Chromosomenzahl führen. Es kam in der 1. meiotischen Telophase die Verteilung von $n - 3n$ bzw. die Kombination von $2n + n + n$ zustande. Im ersteren Fall entstehen nach Ablauf der Meiosis 2 haploide und 2 triploide Gonen je Gonotokont. Der 2. Regulierungsmodus führt zu 2 diploiden und 4 haploiden Gonen.

3. Inmitten tetraploider Antheren wurden vereinzelt triploide PMZ festgestellt. Sie zeigten niemals die für triploide Pflanzen charakteristische Anaphasenverteilung, sondern ausschließlich eine Trennung von $n + 2n$.

4. In den tetraploiden Antheren wurden in geringer Zahl auch diploide sowie hyper- und hypodiploide PMZ gefunden. Ihre Chromosomenzahlen variierten zwischen $2n = 4$ und 46. Es sind also auch im Verlauf der prämeiotischen Mitosen Abregulierungsvorgänge abgelaufen. In der Diakinese lagen die Chromosomen der fraglichen Zellen nahezu ausschließlich in Form von Bivalenten vor, Multivalente traten kaum in Erscheinung.

5. Aus den prämeiotischen und meiotischen Befunden kann geschlossen werden, daß im Zuge dieser Vorgänge eine Trennung ganzer Genome angestrebt und in vielen Fällen auch erreicht wird. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die hierbei entstehenden Keimzellen mit der haploiden Chromosomenzahl vollständige Genome enthalten. Nach Selbstung eines derartig konstituierten tetraploiden Organismus wäre die Bildung diploider Zygoten und damit Organismen durch Befruchtung haploider Keimzellen denkbar.

6. Die Prozesse liefen nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten in verschiedenen Regionen der Pflanze und zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Ontogenese ab. Sie

wurden darüber hinaus bereits vor 3 Jahren an einer tetraploiden Tomate beobachtet. Man kann daher annehmen, daß die aufgefundenen Gesetzmäßigkeiten für das Problem der Abregulierung von allgemeiner Gültigkeit sind.

7. Die Häufigkeit aller beobachteten Regulierungsvorgänge lag nach Berücksichtigung von 12 Antheren bei maximal 1,5% der PMZ dieser Antheren. Der Anteil von Zellen, die in Verbindung mit Regulierungsprozessen zu wirklich funktionsfähigen haploiden Keimzellen führen, liegt jedoch wesentlich unter diesem Maximalwert.

8. Neben den Abregulierungsvorgängen traten in den PMZ noch vielfältige andersartige Störungen sowie Degenerationserscheinungen auf. Sie sind offenbar Ausdruck der hohen zytologischen Labilität der Versuchspflanze.

Dem Direktor des Instituts für Landwirtschaftliche Botanik, Herrn Professor Dr. H. ULLRICH, bin ich für seine großzügige Unterstützung meiner Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

- BARTON, D. W.: Pachytene morphology of the tomato chromosome complement. *Amer. J. Bot.* **37**, 639—643 (1950). — BATTAGLIA, E.: *Nuovo Giorn. bot. ital.*, N. S. **54** (1947). Zit. nach HUSKINS 1948a. — BAUER, H.: Chromosomenforschung. *Fortschr. Zool.* **7**, 256—287 (1941). — BRITTON, D. M., and J. W. HULL: Mitotic instability in *Rubus*. *J. Hered.* **48**, 11—20 (1957). — BROWN, M. S.: A case of spontaneous reduction of chromosome number in somatic tissue of cotton. *Amer. J. Bot.* **34**, 384—388 (1947). — CHRISTOFF, M., and M. A. CHRISTOFF: Meiosis in the somatic tissue responsible for the reduction of chromosome number in the progeny of *Hieracium Hoppeanum* Schult. *Genetics* **33**, 36—42 (1948). — DUARA, B. N., and G. L. STEBBINS: A polyhaploid obtained from a hybrid derivative of *Sorghum halepense* $\times$ *S. vulgare* var. *sudanense*. *Genetics* **37**, 369—374 (1952). — EINSET, J.: Characteristics of parthenogenetic diploids derived from tetraploid maize. *Genetics* **26**, 150 (1941). — EMSWELLER, S. L., and R. N. STEWART: Diploid and tetraploid pollen mother cells in lily chimeras. *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.* **57**, 414—418 (1951). — FRANZKE, C. J., and J. G. ROSS: Colchicine induced variants in *Sorghum*. *J. Hered.* **43**, 107—115 (1952). — FUNKE, C.: Vergleichende morphologische und physiologische Untersuchungen am Pollen diploider und autotetraploider Kulturpflanzen. *Z. Pflanzenzüchtg* **36**, 165—196 (1956). — GAUL, H.: Über meiotische Fragment- und Brückenbildung der Bastarde *Secale* und *Triticum* $\times$ *Agropyrum*. *Chromosoma* **6**, 314—329 (1953). — GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Wien 1949. — GLÄSS, E.: Die Identifizierung der Chromosomen im Karyotyp der Rattenleber. *Chromosoma* **7**, 655—669 (1956a). — Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenlebern. *Chromosoma* **8**, 468—492 (1956b). — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. *Chromosoma* **4**, 298—341 (1951). — Die Chromosomenstruktur der Solanaceen unter Berücksichtigung phylogenetischer Fragestellungen. *Chromosoma* **6**, 539—626 (1954). — GREIS, H.: Vergleichende physiologische Untersuchungen an diploiden und tetraploiden Gersten. *Züchter* **12**, 62—73 (1940). — HANNA, G. K.: Chromosome number of human cervix uteri. *Nature (Lond.)* **176**, 354—355 (1955). — HERTZSCH, W.: Beobachtungen an polyploider *Vicia villosa*. (*Z. Pflanzenzüchtg* **30**, 210—217 (1951). — HUSKINS, C. L.: Segregation and reduction in somatic tissues. I. Initial observations on *Allium cepa*. *J. Hered.* **39**, 311—326 (1948). — Experimentally produced somatic reduction and segregation. *Rec. Gen. Soc. Amer.* **17**, 41—42 (1948b). — Chromosome multiplication and reduction in somatic tissues: their possible relation to differentiation, „reversion“ and sex. *Nature (Lond.)* **161**, 80—83 (1948c). — HUSKINS, C. L., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. IV. Reductional groupings induced in *Allium cepa* by low temperature. *J. Hered.* **41**, 13—18 (1950). — HUSKINS, C. L., and L. CHOUINARD: Somatic reduction: diploid and triploid roots and a diploid shoot from a tetraploid *Rhoeo*. *Genetics* **35**, 115 (1950). — HUSKINS, C. L., and L. M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development. II. Induced mitoses in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. *J. Hered.* **39**, 67—77 (1948). —

KODANI, M.: Sodium ribose nucleate and mitosis. Induction of morphological changes in the chromosomes and of abnormalities in mitotic division in the root meristem. *J. Hered.* **39**, 327—335 (1948). — KOSTOFF, D., u. J. KENDALL: Studies on polyploid plants. III. Cytogenetics of tetraploid tomatoes. *Gartenbauwiss.* **9**, 20—44 (1935). — LEVAN, A.: The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* (Lund) **24**, 471—486 (1938). — The effect of colchicine on meiosis in *Allium*. *Hereditas* (Lund) **25**, 9—26 (1939). — LINNERT, G.: Untersuchungen über die Cytologie polyploider Pflanzen. II. *Chromosoma* **3**, 399—418 (1949). — LOVE, R. M.: Occurrence of haploid pollen mother cells in a vulgare wheat. *Nature* (Lond.) **138**, 589—590 (1936). — MARQUARDT, H.: Die Röntgenpathologie der Mitose. I u. II. *Z. Bot.* **32**, 401—482 (1938). — PATAU, P.: A correlation between separation of the two chromosome groups in somatic reduction and their degree of homologous segregation. *Genetics* **35**, 128 (1950). — PATAU, K., u. R. P. PATIL: Mitotic effects of sodium nucleate in root tips of *Rhoeo discolor* Hance. *Chromosoma* **4**, 470—502 (1951). — PETERS, R.: Vorselektion induzierter autopolyploider Gersten- und Roggenkeimlinge nach der Wurzeldicke. *Züchter* **24**, 128—131 (1954). — QUADT, F.: Beobachtungen an den Nachkommen tetraploider Tomatenbastarde. *Züchter* **25**, 241—245 (1955). — RAMAN, V. S., and N. KRISHNASWANNY: A chromosomal chimera in *Sorghum halepense* (Linn.). *Indian J. Agricult. Sci.* **25**, 47—50 (1955). *Ref. Ber. wiss. Biol.* **101**, 378. — REZENDE-PRINTO, M. C. DE, e A DE LEMOS-PEREIRA: A case of post-meiotic chromatic reduction. *Portugal Acta Biol. A* (Vol. R.B. Goldschmidt) **1950**, 652—662. *Zit. nach TISCHLER 1953.* — ROSENDAHL, G.: Cytologische Untersuchungen an tetraploiden Gersten. *Kühn-Arch.* **60**, 238—252 (1944). — SCHWANITZ, F.: Untersuchungen über den Ertrag getriebener diploider und tetraploider Gartenkresse (*Lepidium sativum*). *Züchter* **13**, 155—160 (1941). — SHARMA, A. K., u. S. SEN: Induction of division through nucleic acid treatment. *Caryologica* (Pisa) **6**, 151—159 (1954). — STEIN, E.: Die Doppelchromosomen im Blütenbezirk der durch Radiumbestrahlung erzeugten Mutante „cancroidea“ von *Antirrhinum majus*. (Somatische Chromosomenreduktion.) *Z. Vererbungslehre* **72**, 267—286 (1936). — SUOMALAINEN, E.: Beiträge zur Zytologie der pathenogenetischen Insekten. I. Coleoptera. *Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A* **54**, 7—143 (1940). *Zit. nach BAUER 1941.* — SWAMINATHAN, M. S.: Einige Verfahren für die Verwendung wilder *Solanum*-Arten zu Zuchtzwecken. *Züchter* **20**, 358—360 (1950). — TAKENAKA, Y.: Cytogenetic studies of *Nicotiana*. I. *Kromosoma* **1951**, Nr 9—10, 384—392. — THERMAN, E., u. S. TIMONEN: Multipolar spindels in human cancer cells. *Hereditas* (Lund) **36**, 393—405 (1950). — TISCHLER, G.: Handbuch der Pflanzenanatomie. Bd. II: Allgemeine Pflanzenkaryologie. *Erg.bd.* Berlin 1953. — VAARAMA, A.: Cryptic polyploidy and variation of chromosome number in *Ribes nigrum*. *Nature* (Lond.) **162**, 782 (1948). — Spindle abnormalities and variation in chromosome number in *Ribes nigrum*. *Hereditas* (Lund.) **35**, 136—162 (1949). — WILSON, G. B.: Cytological effects of some antibiotics. *J. Hered.* **41**, 226—231 (1950). — WILSON, G. B., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. II. The separation of homologous chromosomes in *Trillium* species. *J. Hered.* **40**, 2—6 (1949). — WOLL, E.: Einwirkung von Nukleinsäuren und ihren Baustoffen auf die Wurzelspitzenmitose. *Chromosoma* **5**, 391—427 (1953).

Dozent Dr. WERNER GOTTSCHALK,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität,
Bonn a. Rh., Meckenheimer Allee 176

John Innes Horticultural Institution, Bayfordbury, Hertford, Herts

ABNORMAL GAMETOGENESIS AND EMBRYO ABORTION IN THE PEAR VARIETY BEURRÉ BEDFORD (*PYRUS COMMUNIS*)

By

G. J. DOWRICK

With 7 Figures in the Text

(Eingegangen am 20. Juli 1957)

A. Introduction

Sexual isolation mechanisms in higher plants intervene at different stages of reproduction. Incompatibility between pollen and styles prevents fertilisation while sterility after pollination may be related to abnormal endosperm development as in *Medicago* (COOPER and BRINK 1938, 1940; ATWOOD and GRUN 1951) and *Lycopersicon* (COOPER and BRINK 1945), to the ratios of the chromosome sets of the embryo, endosperm and maternal tissue (MUNTZING 1933) or to genetic unbalance of the developing embryo.

The diploid pear variety Beurré Bedford ($2n = 34$) has an abnormal breeding behaviour when used as the male parent in crosses with both other diploid and with tetraploid varieties. Between 40 and 70% of the fruits formed are parthenocarpic and the few seed they contain give rise to progeny most of which retain the chromosome number of the female parent. The information presented here indicates that this partial sterility results from abortion of genetically unbalanced embryos.

The abnormal breeding behaviour of this variety arises as a direct consequence of abnormalities of pollen grain development. Young pollen grains have four nuclei owing to the failure of cell wall formation after meiosis. Mature pollen grains, however have a variable number of nuclei which differ in ploidy from haploid to tetraploid. THOMAS (1942a and b) reported that this variation in ploidy resulted from nuclear fusion which sometimes followed meiosis. The present study suggests that it results from the fusion of the spindles at the first pollen grain mitosis. The ability of different types of pollen grain to form viable progeny is directly related to the ploidy of the egg cells which they fertilise. There are no abnormalities of embryo-sac development and when Beurré Bedford is used as the female parent in crosses with other varieties fertility is normal.

B. Materials and Methods

Anthers were fixed in absolute alcohol and a saturated solution of ferric acetate in glacial acetic acid (3:1) and prepared as squashes after staining in iron aceto-carmin. Additional iron was added by teasing with steel needles immediately before squashing. Pollen grain development was observed from serial sections of material fixed in Navashin's fluid. Anther sections were cut at 30μ and best results were obtained after staining with iodine in 80% alcohol.

Pollen grains were germinated by the hanging drop technique using a 28% solution of sucrose.

For embryological studies crosses were made using seven different pear varieties as follows:

Control Crosses

Beurré Giffard ♀	$2n = 34 \times$	Conference ♂	$2n = 34$
Bristol Cross	$2n = 34 \times$	Conference	$2n = 34$
Beurré Diel	$2n = 51 \times$	Beurré d'Amanlis	$2n = 51$
Fertility 4x	$2n = 68 \times$	Fertility 4x	$2n = 68$
Bristol Cross	$2n = 34 \times$	Beurré d'Amanlis	$2n = 51$
Fertility 4x	$2n = 68 \times$	Conference	$2n = 34$

Crosses involving Beurré Bedford

Beurré Giffard ♀	$2n = 34 \times$	Beurré Bedford ♂	$2n = 34$
Beurré Diel	$2n = 51 \times$	Beurré Bedford	$2n = 34$
Fertility 4x	$2n = 68 \times$	Beurré Bedford	$2n = 34$

Flower buds were examined at varying intervals after pollination. They were fixed in Carnoy for one minute followed by Navashin for 24 hours. Before embedding in wax the buds were kept in 70% alcohol for at least 21 days. Embryological studies were made from serial sections cut at 22μ and stained with crystal violet. Sectioning was greatly facilitated by soaking the wax blocks in water for seven days immediately before cutting.

C. Pollen grain development

Meiosis in Beurré Bedford appears to be normal until the end of the second division when cell walls are not formed. Consequently the young pollen grains

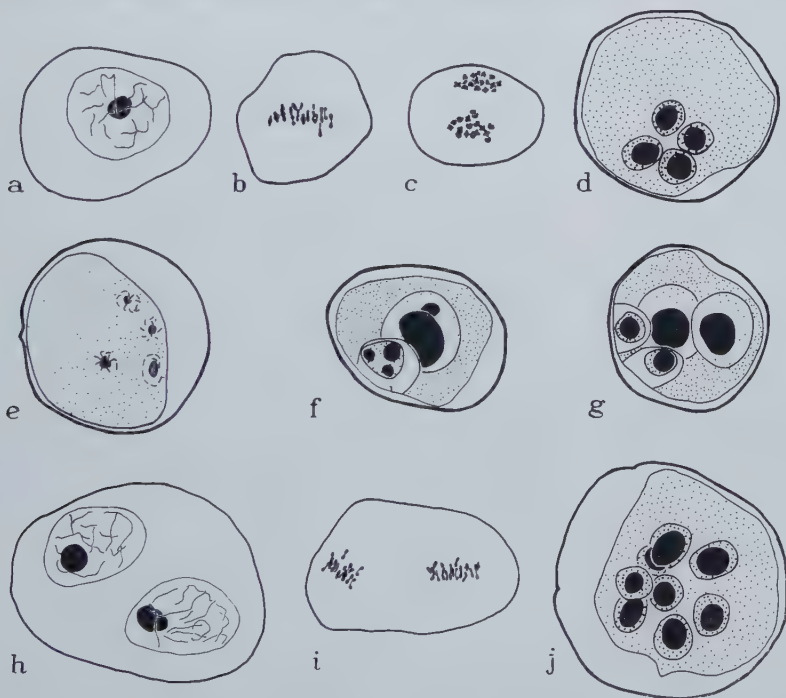


Fig. 1 a—j. Meiosis and pollen grain mitosis in Beurré Bedford. a—d Meiosis. a Prophase I; b M I; c A I and d post meiosis with four nuclei in a single large pollen grain. e—g Pollen grain mitosis. e Prophase; f and g mature pollen grains with one and two generative nuclei respectively. h—j Meiosis in binucleate P.M.C. h Prophase I; i M I; j young eight nucleate pollen grain. $\times 500$

are relatively large and quadrinucleate (Fig. 1a—d). Subsequent development is determined by the spatial relationships of the four nuclei. Immediately after

meiosis the nuclei are separated from each other but later, as a result of movement within the cytoplasm, they usually become closely arranged towards one side of the cell. Occasionally one or two nuclei may remain separate but only rarely do all four stay apart.

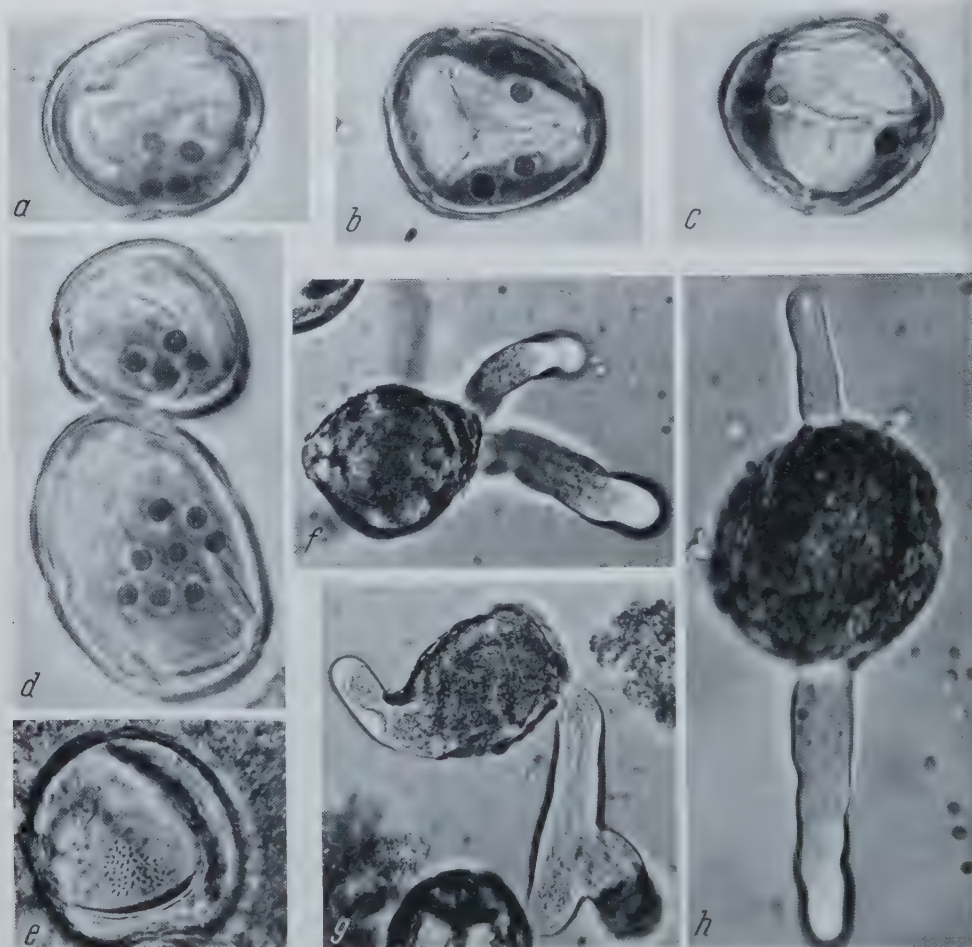


Fig. 2a—h. Pollen grains of Beurré Bedford. a—c Developing pollen. a Four nuclei lying together in the dense region of cytoplasm; b and c abnormal grains with the nuclei separated 2:2 and 3:1 respectively; d two pollen grains, one as in a and one with eight nuclei having arisen from a binucleate pollen grain; metaphase pollen grain mitosis. f—h Different types of pollen grain germination. $\times 530$

The four nuclei, lying in a common cytoplasm, all undergo pollen mitosis simultaneously and, if they are close together, the separate metaphase plates are liable to fuse and their chromosomes come under the influence of a common spindle. This occurs in 81.4% of pollen grains and in these anaphase separation results in the formation of a single tetraploid generative nucleus and a similar vegetative nucleus. When the nuclei are separated each forms its own spindle and therefore additional nuclei are formed (Fig. 1e—g). Five types of mature pollen grain can be formed, they differ in the number and ploidy of their nuclei. Their

frequencies are related to the spatial relationships of the four nuclei at the time of pollen grain mitosis. The different types and their relative frequencies are shown in Table 1.

The tendency of the nuclei of the young pollen grain to aggregate is not a haphazard one. Their positions are determined by a cytoplasmic polarity and they normally lie towards one side and in the most densely staining region of the

Table 1. *The constitution and frequencies of nuclei in pollen grains of Beurré Bedford*

	Constitution of generative nuclei					Total
	4x	3x+x	2x+2x	2x+x+x	x+x+x+x	
Number of pollen grains .	407	47	32	10	4	500
Percentage	81.4	9.4	6.4	2	0.8	100

cell (Fig. 2a). Later in pollen grain development a vacuole is formed. At first it is small and situated in the less dense region of cytoplasm but gradually it enlarges and eventually occupies over half of the cell volume. As a consequence of its enlargement the nuclei tend to be pushed even more closely together. Four nuclei lying together at the dense pole can thus be considered to be the normal situation in young pollen grains of *Beurré Bedford*. Occasionally either weak polarity or the formation of a second vacuole results in one or more nuclei being separated from the remainder.

Individual *Beurré Bedford* pollen grains correspond to tetrads and their cytoplasmic polarity cannot be compared with that found in pollen grains of other plants where it is usually directed towards the centre of the tetrad (LA COUR 1949). Similarly the orientation of the spindle at pollen grain mitosis cannot, as in most plants, be related to the directions of the meiotic spindles (SAX and HUSTED 1936) nor can their development be related to the proximity of other pollen grains as in the *Orchidaceae* and in *Uvularia* (BARBER 1941 and 1942). Polarity within individual pollen grains of *Beurré Bedford* is in fact a reflection of a greater polarity which affects the anther as a whole. Sections of anthers reveal that usually the pollen grain nuclei are situated towards the centre of the anther loculi (Fig. 3).

Pollen grains of *Beurré Bedford* germinate readily in culture — over 80% germination occurs in 28 % sucrose solution. THOMAS (1942b) reported that the pollen tubes were invariably branched but this has not been confirmed in the present experiments. Pollen tubes may be branched but it seems that the amount of branching is directly correlated with sugar concentration — 41 and 86% are branched in 20 and 28% sucrose solutions respectively. When germinated in 28% sucrose solution 24% of pollen grains produced more than one tube (Fig. 2f

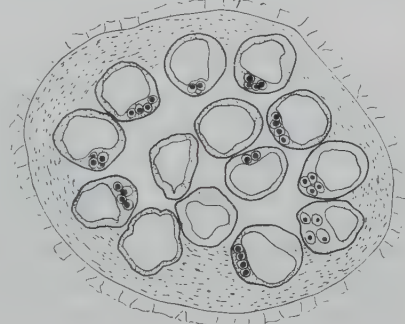


Fig. 3. Section of anther locusus. The nuclei within individual pollen grains are situated towards the centre of the locusus. $\times 200$

to h). These do not always contain nuclei and it is therefore impossible to relate tube number with the numbers of nuclei in different pollen grains (Table 1).

The mature pollen grains of Beurré Bedford are, as might be expected, larger than those of other diploid and also of tetraploid pear varieties. Similarly they

vary more in size than do pollen grains of other varieties (Fig. 4).

The abnormal development of Beurré Bedford pollen grains is a direct result of the failure to form cell walls after meiosis. This abnormality is not confined to the meiotic division, cell walls are occasionally not formed after the last premeiotic mitosis so that one per cent. of pollen mother cells are binucleate (Fig. 1h). The 8 — nucleate pollen grains (Fig. 1j) to which these cells give rise after meiosis probably do not function.

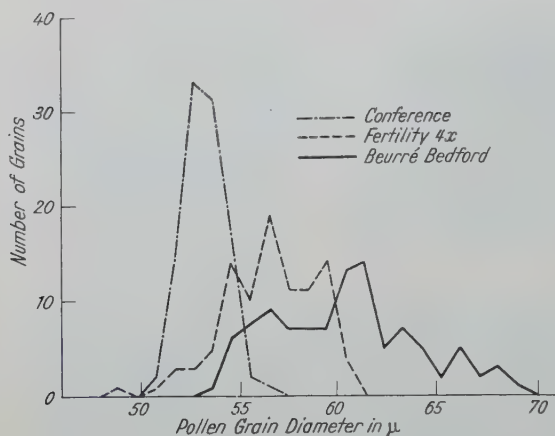


Fig. 4. A comparison of pollen grain size in Beurré Bedford with normal diploid and tetraploid varieties

D. Chromosome numbers of the progeny of Beurré Bedford

It has already been shown that 81.4% of Beurré Bedford pollen grains have a single tetraploid generative nucleus (Table 1). If then Beurré Bedford is crossed with a normal diploid variety it might be expected that most of the progeny would be pentaploid and if it is crossed with a tetraploid, that most of the progeny would be hexaploid. This is not so however as crosses with diploid and tetraploid female parents yield a preponderance of diploid and tetraploid progeny respectively (Table 2). At some stage there must be a very strong selection in favour of male gametes with the same ploidy as the female gametes.

Table 2. Chromosome numbers of the progeny from crosses involving Beurré Bedford

Cross	Chromosome numbers of progeny					Ploidy of Beurré Bedford gametes			
	2x	3x	4x	5x	6x	x	2x	3x	4x
2x × Beurré Bedford	31	—	5	1	—	31	—	5	+
4x × Beurré Bedford	1	1	32	7	2	2	32	7	2
Beurré Bedford × 2x	10	—	—	—	—	10	—	—	—
Beurré Bedford × 4x	—	11	—	—	—	11	—	—	—

From the cross Tetraploid Fertility × Beurré Bedford one diploid seedling arose. It could have originated either by fertilisation of a haploid egg cell or by apomixis. Occasionally haploid egg cells will be formed in Tetraploid Fertility as normal products of meiosis. Alternatively the egg cell giving rise to this seedling might have arisen from the diploid epidermal layer — Tetraploid Fertility being a chimaera of constitution 2—4—?—?.

When Beurré Bedford is used as the female parent, it breeds as a normal diploid variety. The progeny to which it gives rise are all derived from haploid egg cells (Table 2).

E. Embryology

I. Embryo-sac development

The ovary of the pear has five loculi each containing two anatropous ovules. The nucellus of each ovule consists of many layers of cells and is surrounded

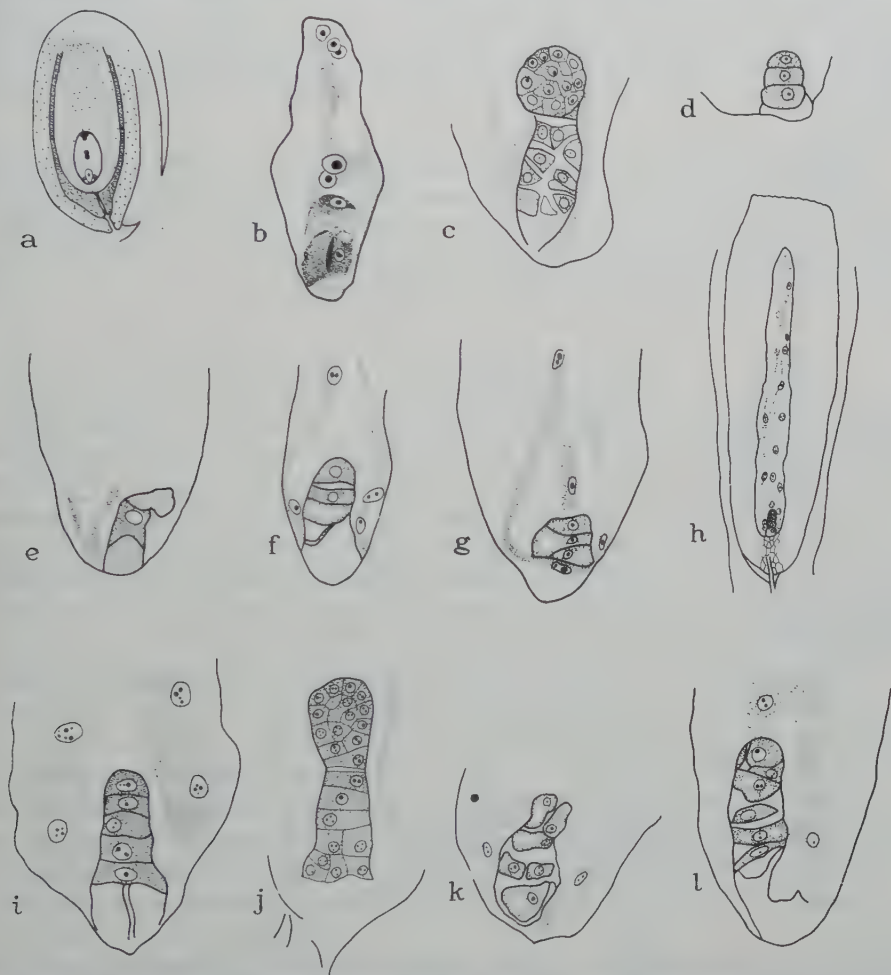


Fig. 5a—l. Embryology. a Diagram of unfertilised ovule. b Mature embryo-sac in Beurré Giffard. c Beurré Giffard × Conference. Embryo 30 days after pollination. d—h Conference × Beurré Bedford; d and h normal embryos nine and ten days after pollination; e, f and g three abortive embryos 15 days after pollination — note normal endosperm development. i—l Fertility 4 × Beurré Bedford; i and j normal embryos 15 and 30 days after pollination; k and l abortive embryos 20 days after pollination.

All × 200 except h which is × 66

by two integuments. The embryo-sac mother cell is derived from a cell of the hypodermal layer of the nucellus.

Embryo-sacs (E. S.) are monosporic in development and eight nucleate. They correspond to the normal or *Polygonum* type of MAHESHWARI (1950). The mature E. S. consists of three antipodal cells, two polar nuclei, two synergids and the egg nucleus (Fig. 5a and b). Various abnormalities of development can occur; these have already been considered fully by WANSCHER (1939).

The antipodals degenerate before fertilisation. The two polar nuclei lie together in the centre of the E. S. Because they lie so close it has frequently been assumed that they fused to form a primary endosperm nucleus. They can, however, be observed lying together in unfertilised E. S. 21 days after pollination. A single primary endosperm nucleus has not been observed. It is assumed here that after fertilisation a common spindle is formed for the chromosomes of the two polar nuclei and the second male nucleus producing two nuclei at the first endosperm division.

The two synergids are of characteristic appearance. They are elongated and have dense cytoplasm and each possesses a large vacuole towards the middle of the E. S. In fertilised ovules these cells degenerate quickly but without fertilisation their vacuoles gradually increase in size until the cells are ruptured. The egg cell is large, spherical and without a vacuole.

II. Embryo development in control crosses

Fertilisation occurs approximately eight and twelve days after pollination in diploid and tetraploid female parents respectively. In all control crosses embryo development began immediately after fertilisation and proceeded normally. Unlike what is found in the apple (WANSCHER 1939), the fertilised egg does not undergo a resting stage, cell division begins immediately and growth is at first at a rate of about one cell division a day. Seven days after fertilisation the pro-embryo consists of a single filament of six or seven cells the basal cell of which is differentiated from the remainder in that it is larger and almost completely vacuolated (Fig 5d).

The terminal cells of the pro-embryo subsequently multiply rapidly to form a solid globe of tissue which later forms the true embryo. From an early stage these terminal cells have a denser cytoplasm than those in the basal region which do

not usually divide further but form a filamentous suspensor. Observations of embryo development were continued until 30 days after pollination when the embryo and suspensor consist of about 100 cells. Differentiation within the embryo does not begin until later (Fig. 5c).

Endosperm development is relatively slow in comparison with most other genera. When the embryo consists of about six cells the endosperm consists of only 16 free nuclei. Nuclear multiplication continues slowly and it is unlikely that the endosperm ever contains as many as the 2,000 free nuclei which WAN-

Table 3. *A comparison of fruit and seed set in diploid and tetraploid pear varieties*

Cross	Flowers pollinated	Fruit set	Seed per fruit
2x × 2x	656	54	8.72
4x × 2x	112	6	7.33
2x × 4x	306	20	7.00
2x × Beurré Bedford	238	7	3.0
4x × Beurré Bedford	203	12	4.1

SCHER reports finding in apple varieties 30 days after pollination. Endosperm development commences around the periphery of the embryo-sac and many of the endosperm nuclei arise after amitotic divisions and are polyploid. The mature

Table 4. *The number of developing embryos in control crosses*

Cross	Days after pollination	Developing embryos	No visible embryos	Total	No. of fruitlets
Beurré Giffard $\times$ Conference	8—20	16	17	33	7
Bristol Cross $\times$ Conference	8—15	17	4	21	3
Fertility 4x $\times$ Fertility 4x	11—29	7	0	7	1
Fertility 4x $\times$ Conference	10—30	27	8	35	7
Bristol Cross $\times$ Beurré D'Amanlis . . .	30	3	4	7	1
Beurré Diel $\times$ Beurré D'Amanlis . . .	15—19	1	8	9	2

endosperm is cellular and wall formation must begin shortly after 30 days from pollination.

Within any variety the number of fertilised ovules, whether determined from embryological studies or from seed set, varies greatly between flowers and between seasons. Similarly there may be considerable variation between varieties (Tables 3 and 4).

In both apple and pear varieties twin embryos are occasionally found. They can be of two types. Most frequently the two embryos are surrounded by a common endosperm and less frequently each has a separate endosperm. One pair of twins of the more common type was seen in progeny of Tetraploid Fertility selfed, 29 days after pollination (Fig. 6). The differences in size between them may be related to differences in their genetical make-up or simply be a reflection of competition for the available food materials. In this example the egg cell of one of the twins may have been formed from a synergid.

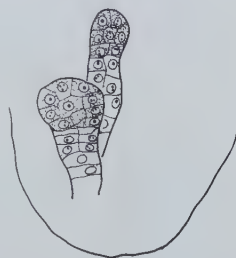


Fig. 6. Twin embryos from the cross Fertility 4x $\times$ Fertility 4x. $\times 200$

III. Crosses involving Beurré Bedford

When Beurré Bedford is used as male parent seed set is lower than in control crosses (Tables 3 and 5). The number of seeds formed per flower was higher when it was used with tetraploid female parents than with diploid. No seeds were obtained with triploid female parents. In all three crosses a large proportion of ovules must either remain unfertilised or, if fertilised, the developing embryos must fail to reach maturity.

1. *Beurré Giffard $\times$ Beurré Bedford and Bristol Cross $\times$ Beurré Bedford.* In 79 ovules examined from these crosses only six normal embryos were observed; in these embryo and endosperm development were similar to control crosses (Figs. 5h and 7a). In 48 ovules no embryos were seen while in the remaining 25 the embryos had aborted. These 25 ovules are of particular interest when considering the unusual breeding behaviour of Beurré Bedford. In twenty of them the embryos were three celled filaments and must have aborted 3 or 4 days after fertilisation. The other five aborted later, at the five or six celled stage.

These embryos have a characteristic appearance. They have a narrow terminal cell which is frequently crozier-like while the basal cell is triangular and often appears to be only loosely connected with the maternal tissue (Figs. 5e and 7d). Associated with embryo breakdown is an abnormal accumulation of carbohydrate material within the embryo-sac.

In all 25 the nucellus and integuments were normal, the abnormalities being confined to the embryo. Although endosperm development began normally and actively dividing endosperm nuclei were observed in ovules where the embryos

Table 5. *The number of normal and aborting embryos in crosses involving Beurré Bedford*

Cross	Days after polli- nation	Deve- loping Em- bryos	Abor- tive Em- bryos	No visible Em- bryos	Total	No. of fruit- lets
Beurré Giffard $\times$ Beurré Bedford	10—11	1	5	23	29	5
	13—15	1	13	15	29	5
	29	2	0	2	4	1
	Total	4	18	40	62	11
Bristol Cross $\times$ Beurré Bedford	13—15	2	7	8	17	3
Beurré Diel $\times$ Beurré Bedford	10	0	0	7	7	1
Fertility 4x $\times$ Beurré Bedford	11	0	0	13	13	2
	15—16	0	22	26	48	7
	20	9	16	5	30	6
	30	6	2	0	8	2
Total		15	40	44	99	17

were already partially broken down the development did not proceed beyond the formation of 16 nuclei.

In at least 35 of the 48 ovules in which no embryo was observed pollen tubes were seen to have penetrated the embryo-sac. The failure of embryo development in these ovules was not therefore related to pollen sterility and it is likely that fertilisation had occurred in most instances but development failed to proceed further. Most of the 48 ovules could then be classified along with those which abort later, in the three to four celled embryo stage: they were fertilised ovules which aborted at a particularly early stage. The embryos which develop normally give rise to seedlings predominantly diploid in constitution, i. e. they involve haploid Beurré Bedford gametes. The abortive embryos therefore represented those formed from diploid, triploid and tetraploid Beurré Bedford gametes.

It is assumed that development usually proceeds normally only when there is perfect balance between the number of sets of chromosomes in the gametes of male and female parents. In these crosses this will be achieved only when haploid pollen nuclei effect fertilisation while greatest unbalance will result after fertilisation with tetraploid pollen grains. It is suggested that most of the 35 ovules in which no embryos were observed were fertilised by tetraploid gametes.

2. *Fertility 4x $\times$ Beurré Bedford.* From total of 99 ovules of this cross examined 15 contained normal embryos, a relatively higher proportion than in the diploid crosses (Figs. 5i and j, and 7b and c). Similarly the number of ovules

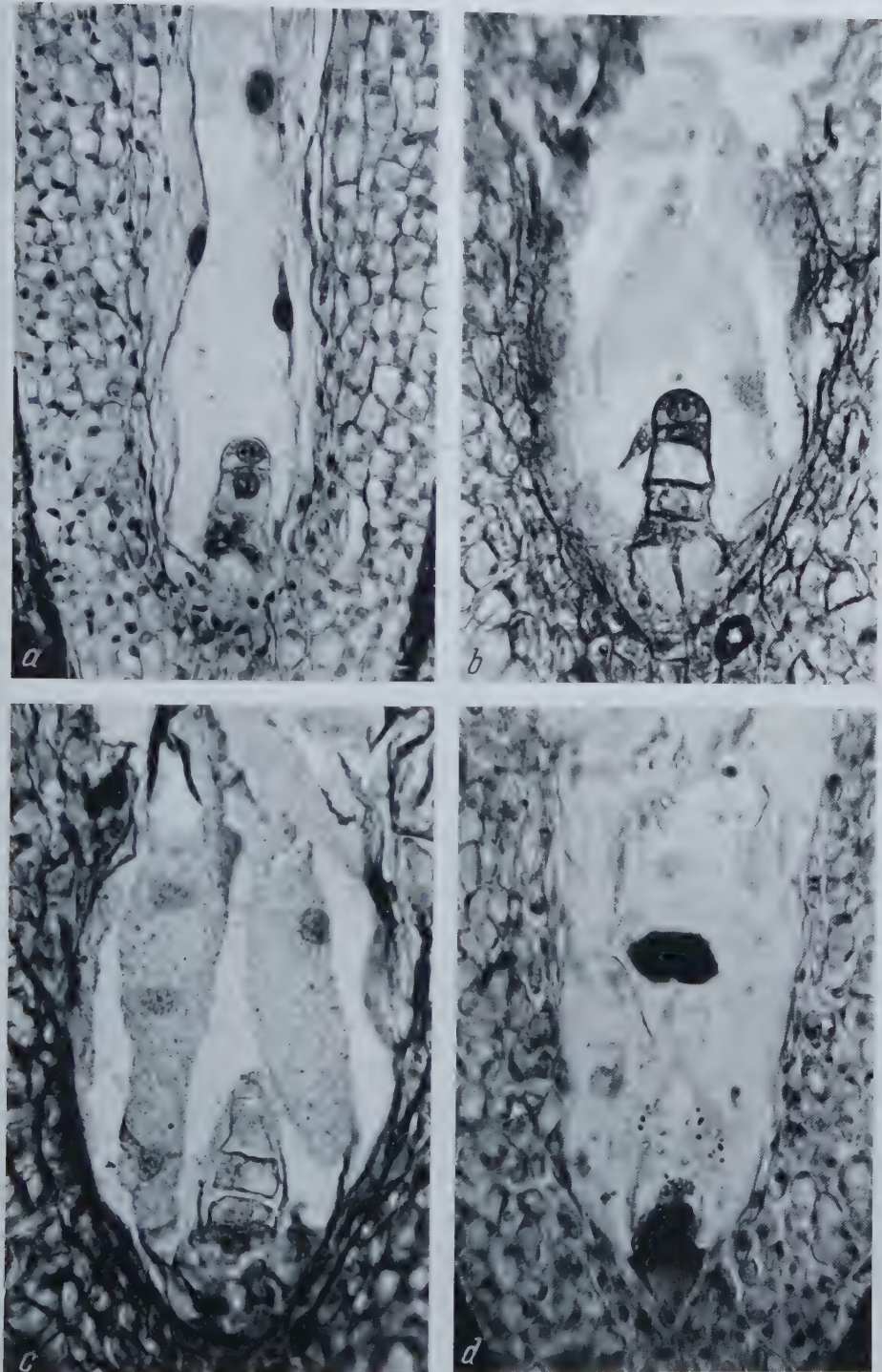


Fig. 7a—d. Embryology. a Conference $\times$ Beurré Bedford ten days after pollination. b and c Fertility 4 $\times$ Beurré Bedford 15 days after pollination. In these three ovules embryo development is normal. d Conference $\times$ Beurré Bedford. Abortive embryo 15 days after pollination. Note accumulation of carbohydrate material. $\times 380$

in which there was no evidence of embryo abortion was proportionally less (Table 5). Embryo breakdown was characteristically later than in the previous crosses, it occurred when the embryos were of at least six cells. Also their appearance was different, abortive embryos had highly vacuolated cells the walls of which tended to crumple (Fig. 5k and l). As in the crosses involving Beurré Giffard and Bristol Cross endosperm development was normal in ovules where embryo breakdown occurred and similarly there were no abnormalities of other parts of the ovule.

The majority of progeny from this cross were tetraploid and had therefore involved diploid Beurré Bedford pollen grains. The abortive ovules were probably those in which the number of sets of chromosomes from the male and female parents were numerically unbalanced in the zygote.

In both this and the previous crosses it was clear that the proportion of normal embryos observed was greatly dependent on the age of the bud at the time of observation. Older buds had relatively more normal embryos. Fruits with a low number of developing embryos abscised relatively early and the differences in the number of developing embryos observed in buds of different ages were simply a reflection of this.

3. *Beurré Diel* (3x) $\times$ *Beurré Bedford*. No fruits from this cross reached maturity. All had fallen within 25 days of pollination and in those examined histologically no developing embryos were observed. Probably a lack of viable gametes in the triploid female parent is directly responsible for this sterility.

F. Discussion

Two factors are mainly responsible for the abnormal breeding behaviour of Beurré Bedford. They are failure of formation of cell walls after meiosis in pollen mother cells and embryo abortion. Similar abnormalities of pollen grain development have not been found in any other pear variety but they have been reported in *Zea* following heat treatment (LEBEDEFF 1940). The embryo abortion which sometimes occurs following fertilisation with Beurré Bedford pollen grains has not been observed when other male parents are used. Beurré Bedford originated from a cross between the diploid pear varieties Marie Louise $\times$ Durondeau. Neither parent has any abnormality in its breeding behaviour.

The abnormalities of pollen grain development would, by themselves, result in a high proportion of progeny with high chromosome numbers. This does not happen, it is prevented by the differential survival of the embryos formed. When Beurré Bedford is used as the male parent development usually proceeds normally only when there is perfect balance between the number of chromosome sets of the male and female sex nuclei. When this balance is not achieved the embryos abort. Whether this balance is related to the whole chromosome set or to a single gene within a chromosome is unknown though the former is perhaps more likely. Whichever it may be, embryo development in crosses involving Beurré Bedford pollen is dependent on an embryo lethal mechanism which is itself controlled by the balance between the number of chromosome sets of the male and female sex nuclei. The effects of the abnormal pollen grain development are compensated by the effects of abnormal embryology. It would seem highly probable that the two factors arose simultaneously. Nevertheless it is only when the Beurré Bedford

genome is in excess that unbalance results in sterility. When there is a deficiency, as in the cross Beurré Bedford $\times$ $4x \text{ } \sigma$ (Table 2), development proceeds normally.

The successful development of fertilised embryos depends on chromosome balance within the embryo and on the genetic relationship between the embryo, endosperm and maternal tissue. MUNTZING (1933) arguing from evidence of backcrosses of F_1 hybrids to parental species suggested that fertility was related to the balance between the chromosome sets of all three tissues. The diploid F_1 hybrids between, for example, *Raphanus* $\times$ *Brassica* and *Nicotiana rustica* $\times$ *N. paniculata* form some unreduced ovules and these give rise to viable progeny when fertilised by pollen of the parental species. Similar crosses with diploid egg cells formed by the amphidiploids of these F_1 hybrids are sterile. MUNTZING considered that, as the only difference between these crosses was in the chromosome number of the female parent, fertility must have depended not only on embryo-endosperm relationships but also on their relationship to the maternal tissue. It is likely that an incompatibility effect between embryo and maternal tissue exists in such wide intergeneric and interspecific crosses and that its expression can be influenced by a dosage effect of the chromosomes of the female parent. MUNTZING's argument does not require consideration of the endosperm and in the examples he quoted sterility could have been attributed simply to embryo-maternal tissue relationships.

However, such an incompatibility effect would not be expected in intraspecific and intravarietal crosses. In *Lycopersicon* and *Medicago* for example both observational evidence and the genetic similarity of the parents suggest that embryo-endosperm relationships determine whether or not a cross will be fertile. In these two genera it is found that there is a close correspondence between seed failure of species hybrids and crosses between diploid and tetraploid forms of the same species. Embryological studies show that in sterile crosses, the endosperm grows abnormally slowly and that the endothelium becomes hyperplastic filling the space normally occupied by the endosperm. The embryo grows slowly and is small and starved. Normal development occurs only in crosses within species and then only between forms of similar ploidy. In *Lycopersicon* and *Medicago* development succeeds only when the chromosomes of the embryo and endosperm are correctly balanced.

It is possible to consider both embryo-endosperm and embryo-maternal tissue relationships at the same time; thus in a cross between two diploids the balance between the number of chromosome sets of embryo, endosperm and maternal tissues is $2-3-2$. In crosses between parents of different ploidy the ratios will be upset and sterility may result. The ratios will vary in reciprocal crosses between parents of different ploidy and the crosses may as a result differ in their fertility.

Evidence that none of these relationships is the cause of sterility in the present example can be obtained from control crosses (Table 3). It will be seen that the crosses $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$ were highly fertile giving 7.00 and 7.33 seed per fruit respectively. The progeny to which they gave rise were almost exclusively triploid. The chromosome ratios in these cases differ both between themselves and from the normal $2-3-2$ diploid ratios. They are $3-4-2$ and $3-5-4$ respectively. Thus, disturbance of the ratios does not in the pear affect fertility.

In the crosses $2x \times$ Beurré Bedford and $4x \times$ Beurré Bedford fertilisation by diploid and haploid pollen respectively should therefore give rise to viable triploid progeny. The percentages of haploid and diploid nuclei in Beurré Bedford pollen grains are 14 and 12 respectively. These should also be the percentages of triploid progeny in these two crosses. The frequency with which triploids are formed is, however, much below expectation (Table 6).

Table 6. *A comparison of the expected and actual numbers of triploid progeny produced in two Beurré Bedford crosses*

	Total Progeny	No. of Triploids	No. of Triploids expected	χ^2	P
$2x \times$ Beurré Bedford	37	0	5	5.8	<0.01
$4x \times$ Beurré Bedford	43	1	6	4.8	<0.03
Totals	80	1	11	10.4	<0.002

None of these ratios can then explain the differential selection of zygotes in Beurré Bedford crosses. The selection must be related to balance of the maternal and paternal chromosomes within the embryo itself.

Summary

1. Nuclei of pollen grains of the diploid pear variety Beurré Bedford ($2n = 34$) vary in ploidy between haploid and tetraploid.
2. Young pollen grains have four nuclei as a result of the failure of cell wall formation after meiosis. These nuclei are usually closely arranged towards one side of the cell. At the first pollen grain mitosis fusion of spindles may occur. In 81.4% of pollen grains the four spindles fuse and give rise to mature pollen grains with a single tetraploid generative nucleus. In the remainder one or more nucleus remains free and in there are a variable number of haploid, diploid and triploid nuclei. Where no fusion occurs the mature pollen grain contains four generative and four vegetative nuclei.
3. The spatial relationships of the nuclei in the young pollen grain are determined by gradients passing across the anther loculus and therefore across the individual pollen grains.
4. Embryo-sac development is normal in Beurré Bedford and the egg cells produced are haploid. The progeny to which they give rise have the expected chromosome numbers.
5. When Beurré Bedford is crossed with diploid and tetraploid female parents it yields a preponderance of diploid and tetraploid progeny respectively. Most embryos whose chromosome number is not the same as that of the female parent abort before reaching maturity.
6. In crosses with diploid female parents the "unbalanced" embryos do not develop beyond three cells and with tetraploid female parents beyond six cells. There are no abnormalities of the endosperm in ovules containing abortive embryos. It is postulated that breakdown is due to an embryo lethal mechanism which is itself controlled by the balance between the number of chromosome sets of the male and female sex nuclei.

References

- ATWOOD, S. S., and P. GRUN: Cytogenetics of alfalfa. Bibliogr. genet. (s'Gravenhage) **14**, 138—185 (1951). — BARBER, H. N.: Chromosome behaviour in *Uvularia*. III. Cooperation and balance in pollen grains. J. Genet. **42**, 245—257 (1941). — The pollen grain division in the *Orchidaceae*. J. Genet. **43**, 97—103 (1942). — BRINK, R. A., and D. C. COOPER: Somatoplastic sterility in *Medicago sativa*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **24**, 497—499 (1939). — COOPER, D. C., and R. A. BRINK: Partial self-incompatibility and the collapse of fertile ovules as factors affecting seed formation in alfalfa. J. Agricult. Res. **60**, 453—472 (1940). — Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium*. Genetics **30**, 376—401 (1945). — LA COUR, L. F.: Nuclear differentiation in the pollen grain. Heredity (Lond.) **3**, 319—337 (1949). — LEBEDEFF, G. A.: Failure of cytokinesis during microsporogenesis in *Zea mays* following heat treatment. Cytologia **10**, 434—442 (1940). — MAHESHWARI, P.: An introduction to the embryology of angiosperms. New York: McGraw Hill Book Co. Inc. 1950. — MÜNTZING, A.: Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. Hereditas (Lund) **18**, 33—55 (1933). — SANSOME, E. R., S. SATINA and A. F. BLAKESLEE: Disintegration of ovules in tetraploid-diploid and in incompatible species crosses in *Datura*. Bull. Torrey Bot. Club **69**, 405—420 (1942). — SAX, K., and L. HUSTED: Polarity and differentiation in microspore development. Amer. J. Bot. **23**, 606—609 (1936). — THOMAS, P. T.: John Innes Horticultural Institution Annual Report 1942a. — A useful abnormality of pollen in a pear. Nature (Lond.) **149**, 168 (1942b). — WANSCHER, J. H.: Contributions to the cytology and life history of apple and pear. Kon. Veterin.-Landsbohøjsk. Aarskr. **1939**, 21—70.

Dr. G. J. DOWRICK, John Innes Horticultural Institution,
Bayfordbury, Hertford, Herts. England

Department of Genetics, College of Agriculture
University of Wisconsin, Madison, Wisconsin

PLANT COLOR EFFECTS OF CERTAIN ANOMALOUS FORMS OF THE R^r ALLELE IN MAIZE*

By

R. A. BRINK and B. MIKULA

(Eingegangen am 9. Oktober 1957)

Introduction

The R locus in maize conditions anthocyanin formation in both seed and plant. Pigmentation of the two structures may be varied independently, however, by choice of the appropriate R genes. EMERSON (1921) postulated four alleles at the R locus, R^r , R^g , r^r , and r^g , in accounting for inheritance of the principal aleurone and plant color types. R and r denote colored and colorless aleurone, respectively, and the superscripts signify red and green (absence of anthocyanin) in the anthers, and certain other plant parts.

BRINK (1956) has shown that the aleurone pigment-producing action of R^r (colored aleurone, red plant) is genetically reduced with complete regularity to a lower level, originally symbolized by R' (now designated $R^{r:st}$), in heterozygotes with R^{st} (stippled). Stippled is a "pattern" allele, conditioning spotted aleurone, although the anthers are uniformly green. The present investigation deals with the corresponding effects on plant color of the changed forms of R^r arising in heterozygotes with stippled and two other pattern alleles, light stippled (R^{lst}), and marbled (R^{mb}).

The complexity of the R locus suggested by EMERSON's observation that all four combinations of major aleurone and plant colors occur naturally has since been demonstrated by STADLER (1951, 1954), STADLER and NUFFER (1953), and STADLER and EMMERLING (1956). These investigators have visualized the locus in terms of genic elements which are individually mutable and which recombine infrequently by crossing over. One such element has been designated "S" and another, "P", referring to seed and plant color. STADLER (1954) postulated other elements also. He assumed that each genic element occurs in different forms, and may be further divisible. Each kind of element also may be present more than once in a given R allele.

Looked at from the standpoint that the R locus is compound the present problem was to determine whether the change arising in the aleurone color component(s) of R^r in $R^r R^{st}$, and corresponding heterozygotes, applies also to the plant color component(s).

The plant color effects which were quantitatively scored were those manifested at the seedling stage in coleoptile, leaf sheath, and root.

* Paper No. 677 from the Department of Genetics, College of Agriculture, University of Wisconsin.

Material and Methods

The same R^r gene as used in the aleurone study (BRINK 1956) was employed in the present investigation. It, as well as R^{st} , R^{lst} , and R^{mb} alleles, had previously been incorporated in a uniform inbred dent corn line called W 22. R^r , on this background, conditions strong development of anthocyanin in the seedling roots and first internode above the cotyledon, provided these tissues are exposed to light, and in the anthers. Lesser amounts of pigment form in the coleoptile and leaf sheaths.

R^{st} , R^{lst} and R^{mb} , here tested for their effect in heterozygotes in genetically changing R^r plant color action, were known already to alter in specific ways the aleurone pigment-producing properties of R^r in $R^r R^{st}$, $R^r R^{lst}$, and $R^r R^{mb}$ plants (BRINK 1956; BRINK and WEYERS in press; and unpublished data).

The distinguishing characteristic of stippled (R^{st}) is a dense pattern of colored spots in the aleurone, the outer layer of endosperm cells. Light stippled (R^{lst}), a rather frequent mutant from R^{st} , is similar, but exhibits distinctly fewer spots. Marbled (R^{mb}) kernels form a few relatively large, irregularly shaped patches of color in the aleurone. Stippled, light stippled, and marbled plants are readily distinguished from R^r individuals by the absence (or near absence, in the case of R^{mb}) of anthocyanin in the light-exposed seedling roots and first internode above the cotyledon, and in the anthers. These criteria still serve for a definitive separation when R^r is present in one or another of the modified forms arising in heterozygotes with R^{st} , R^{lst} , or R^{mb} .

It is assumed in the present paper that light stippled is an allele of stippled, although the possibility that the difference is due to a modifier closely linked with the R locus has not been excluded.

The mating plan

The three kinds of heterozygotes, $R^r R^{st}$, $R^r R^{lst}$, and $R^r R^{mb}$, within the W22 inbred stock were produced by crossing stippled, light stippled, and marbled individuals with plants from a standard $R^r R^r$ culture. Pollen from these F_1 individuals then was applied to the silks of an unrelated inbred line, W23, which is $r^g r^g$ (colorless aleurone, green plant). The controls used were F_1 hybrids obtained directly by pollinating W23 by standard $R^r R^r$. R^r was known from previous tests to be stable in $R^r r^g$ heterozygotes.

The W23 ♀ × W22 ♂ testercross kernels carrying the three modified forms of R^r were separated provisionally from the respective, equally frequent stippled, light stippled, and marbled segregates on the basis of aleurone phenotype. Classification was then routinely verified by the seedling pigmentation test referred to in the third paragraph preceding.

Production of seedlings

The root and coleoptile specimens for scoring were taken from seedlings grown on moistened pads of germinating paper covered with paper towelling, in aluminium pans. Standard and test kernels, dusted with Arasan, and placed germinal side down in rows, were included in each pan. The pans were then made light-tight with aluminium foil, and incubated at 80° F for three days.

The coleoptile and roots emerged from the seed during this period and, being in the dark, remained free, or almost free, of anthocyanin. The seedlings were then exposed uniformly to the light from four 40W fluorescent, white tubes, about one foot above the pans. Samples of 20 seedlings in each test lot, and from the control, were taken for scoring anthocyanin pigmentation in the coleoptiles and roots at daily intervals up to four days after initial exposure to light.

The leaf sheath samples were taken from seedlings grown in vermiculite in wooden flats. The flats were held at 90° F for five days in a closed chamber illuminated with six 40W fluorescent, white tubes. Anthocyanin pigment began to appear in the leaf sheaths on the fifth day under these conditions. The flats were then removed from the enclosure to an open greenhouse bench, and held for 24 hours before sampling the seedlings. The prevailing greenhouse temperature was about 70° F. Greenhouse light conditions were those characteristic of mid-winter at Madison, Wisconsin, that is, the intensity was rather low and the duration about 10 hours. A relatively high level of leaf sheath pigmentation in the controls resulted from this treatment.

Scoring techniques

Anthocyanin in the roots was scored according to a color scale especially devised for the purpose. Among various dyes which were tested it was found that "McCormick Red", a substance used in artificially coloring foods, was comparable in hue to the root pigment. Narrow strips of filter paper were impregnated with this substance at eight doubling dilutions, dried, mounted on a white card, and then used as the standard. Two-centimeter segments of light-exposed primary roots, in fresh condition, from a predetermined position, were similarly mounted, and then matched on the numerically graded color scale.

The chlorophyll in the coleoptile and leaf sheath, and irregularities in color distribution, made it impossible to use the same procedure in scoring anthocyanin in these structures. Pigmentation in these cases was evaluated, therefore, by direct comparison of test specimens and controls. Each coleoptile was severed from the seedling just beneath the node, and mounted in fresh condition on a small white card. Twenty such test specimens and an equal number of controls (from W23 *rr* $\times$ W22 standard *RrRr* seedlings) were thus prepared in each experiment. Pairs were formed by drawing at random a test specimen and a control. The paired specimens were then compared with each other. The member of the pair which was found to be the more strongly pigmented was given a value of 2, and the partner a value of 0. Each was accorded a value of 1 if both appeared to be equally colored.

The first leaf sheath was removed by cutting the stem at the coleoptile node and at the level of the first ligule. It was mounted on a card, and then scored for anthocyanin color according to the pairing procedure between test and control specimens outlined in the preceding paragraph.

The root samples and the respective paired coleoptile and leaf sheath specimens were first mounted and coded, and then scored independently by two people who had not been concerned with preparation of the material.

Symbols

The standard R^r allele is represented by that symbol, in conformity with established usage. The altered forms of R^r which arise in the three heterozygotes under test are designated by symbols, as follows:

$R^{r:st}$ = the R^r form arising in $R^r R^{st}$ (heterozygous stippled) plants.

$R^{r:lst}$ = the R^r form arising in $R^r R^{lst}$ (heterozygous light stippled) plants.

$R^{r:mb}$ = the R^r form arising in $R^r R^{mb}$ (heterozygous marbled) plants.

$R^{r:st}$, $R^{r:lst}$, and $R^{r:mb}$ are different genetic entities, although the data on which this conclusion is based have been published only in part (BRINK 1956; BRINK and WEYERS in press).

Experimental Results

Coleoptile color

Seven independent tests were made in which the coleoptile color of $R^{r:st} r^g$ seedlings was compared, by the pairing method, with the color of this structure in standard $R^r r^g$ seedlings reared under the same conditions. Readings were

Table 1. Color scores for $R^{r:st} r^g$ and $R^r r^g$ coleoptiles

Experiment No.	I		II	III			IV			V			VI			VII			Total pairs
Days after exposure to light	1	2	1	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
First reader's scores																			
Seedling pairs																			
<i>R^{r:st}</i> (0)	14	9	7	4	7	4	7	4	9	4	11	4	13	9	11	15	14	13	159*
<i>R^{r:st}</i> (1)	6	6	9	12	9	11	8	9	5	12	7	11	0	0	1	0	1	1	108
<i>R^{r:st}</i> (2)	0	5	4	4	4	5	5	7	6	4	2	5	7	10	2	5	5	6	86*
Total pairs	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	14	20	20	20	353
Mean scores for above																			
	.30	.80	.85	1.00	.85	1.05	.90	1.15	.85	1.00	.55	1.05	.70	1.05	.36	.50	.55	.65	.75
Second reader's scores																			
Seedling pairs																			
<i>R^{r:st}</i> (0)	16	9	8	5	8	7	10	5	9	5	10	3	12	9	11	14	15	12	168*
<i>R^{r:st}</i> (1)	3	5	7	10	7	10	5	8	5	11	5	13	2	2	1	4	0	1	99
<i>R^{r:st}</i> (2)	1	6	5	5	5	3	5	7	6	4	5	4	6	8	2	2	5	7	86*
Total pairs	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	14	20	20	20	353
Mean scores for above																			
	.25	.85	.85	1.00	.85	.80	.75	1.10	.85	.95	.75	1.05	.70	.95	.36	.40	.50	.75	.73

> = darker than; < = lighter than.

* Assuming $R^r > R^{r:st}$ should equal $R^r < R^{r:st}$, the difference is significant beyond the 1% level.

made in five of the tests on sub-samples taken 1, 2, and 3 days after first exposure of the coleoptiles to light. The results are summarized in Table 1.

The data show, in the first place, that the scores arrived at by the two readers, who evaluated the coded specimens independently, were consistent. Variations in the scores occur, as illustrated by the first row of entries in experiment IV, Table 1, but they are of minor importance for the series as a whole.

Anthocyanin development in $R^r r^g$ and $R^{r:st} r^g$ coleoptiles was adjudged equal in about 30% of the 353 pairs. There was a marked preponderance of cases among the remaining pairs in which the $R^r r^g$ member exceeded $R^{r:st} r^g$ in pigmentation. It would be expected that the frequencies of the $R^r > R^{r:st}$ and $R^r < R^{r:st}$ pairs in the last column of table 1 would be equal if the pigment-producing action of $R^{r:st}$ were equal to that of R^r . The $R^r > R^{r:st}$ class, however, is in large excess, and the departure from equality is highly significant statistically.

The two readers' mean score for $R^{r:st}$ was .74, and in only two of the 18 sets of comparisons made was the order reversed.

It may be concluded, therefore, that the potential of R^r for coleoptile pigmentation is significantly reduced in $R^r R^{st}$ heterozygotes.

Table 2. Color scores for $R^{r:st} r^g$ and $R^r r^g$ coleoptiles

Experiment No.	II	III			IV			V			VI			VII			Total pairs
Day after exposure to light	1	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
First reader's scores																	
No. seedling pairs																	
$R^r > R^{r:st}$ (0)	19	12	18	20	19	16	14	20	19	19	13	17	20	14	16	11	267
$R^r = R^{r:st}$ (1)	1	7	2	0	0	4	6	0	1	1	0	1	0	2	1	3	29
$R^r < R^{r:st}$ (2)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	7	2	0	4	3	6	24
Total pairs	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	320
Mean scores for above																	
$R^{r:st}$	.05	.45	.10	.00	.10	.20	.30	.00	.05	.05	.70	.25	.00	.50	.35	.75	.24
Second reader's scores																	
No. seedling pairs																	
$R^r > R^{r:st}$ (0)	18	10	18	20	19	19	15	20	20	19	12	15	20	12	15	11	263
$R^r = R^{r:st}$ (1)	2	8	2	0	0	1	4	0	0	1	2	3	0	6	2	3	34
$R^r < R^{r:st}$ (2)	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	6	2	0	2	3	6	23
Total pairs	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	320
Mean scores for above																	
$R^{r:st}$	.10	.60	.10	.00	.10	.05	.30	.00	.00	.13	.70	.35	.00	.50	.40	.75	.27

Coleoptile pigmentation was found to be reduced in even greater degree in $R^{r:st} r^g$ seedlings. The data in table 2 show lower average scores for $R^{r:st} r^g$ than for the $R^r r^g$ controls in all 16 of the comparisons made. The amount of color in the $R^r r^g$ member fell below that of its $R^{r:st} r^g$ partner in only 24 of the 320 pairs formed. The mean score for $R^{r:st}$, based on both readers' determinations, was .25.

The $R^r r^g$ controls referred to in tables 1 and 2 were the same specimens, and the $R^{r:st} r^g$ and $R^{r:st} r^g$ seedlings with which they were compared (except in experiment I, in which $R^{r:st} r^g$ was lacking) were produced beside each other in the same pans. The fact that the $R^{r:st} r^g$ coleoptiles consistently rated lower than the $R^{r:st} r^g$ coleoptiles, relative to a common set of controls, is evidence that the genetic effect on the coleoptile color-determining action of R^r is more extreme in R^{st} than in R^{st} heterozygotes.

Less extensive comparisons of coleoptile pigmentation were made between standard $R^r r^g$ and $R^{r:mb} r^g$ seedlings. The data obtained are summarized in

Table 3. They show that the altered form of *R^r* arising in heterozygotes with marbled reduces anthocyanin formation in the coleoptile, as in the *R^r:st* and *R^r:lst* cases just described. Six sets of comparisons, involving 120 pairs of coleoptiles, were made in this series. The data from one set (experiment II, second day's reading) do not conform to the other results, and the scores arrived at by the two readers do not agree in this instance. Aside from this irregular set, however, there is a clear preponderance of cases showing that *R^r:mb* is inferior in coleoptile pigmentation to standard *R^r*. The mean score for *R^r:mb*, .54, bears out this conclusion.

Leaf sheath color

The data in tables 4 and 5 show that the effects of *R^r:st* and *R^r:lst* on leaf sheath pigmentation are comparable to the effects on coleoptile color. Common populations of *R^rr^g* seedlings again served as controls in measuring the action of both the *R^r:st* and *R^r:lst* alleles.

R^r:st r^g and *R^rr^g* leaf sheath color was compared in four separate experiments. The greenhouse temperature was too high, following removal of the seedlings from the 90° F incubation chamber, in one of these (III) to give maximum pigmentation. Many of the pairs in this experiment, consequently, were alike in color. The data from the other three experiments show that, whereas the difference in leaf sheath pigmentation of *R^rr^g* and *R^r:st r^g* seedlings is not widely different, the former usually developed the greater amount of anthocyanin. The mean score for *R^r:st* was .57.

The data in table 5, demonstrate clearly that the altered form of *R^r* arising in *R^rR^{lst}* heterozygotes reduces leaf sheath color. Pigmentation of *R^rr^g* exceeded

Table 3. Color scores for *R^r:mb r^g* and *R^rr^g* coleoptiles

Experiment No.	I			II			Total pairs
Day after exposure to light	1	2	3	1	2	3	
First reader's scores							
No. seedling pairs							
$Rr > Rr:mb$ (0)	14	18	10	15	9	12	78
$Rr = Rr:mb$ (1)	1	1	6	3	4	2	17
$Rr < Rr:mb$ (2)	5	1	4	2	7	6	25
Total pairs	20	20	20	20	20	20	120

Mean scores for above

<i>R^r:mb</i>	.55	.15	.70	.35	.90	.70	.56
-------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Second reader's scores

No. seedling pairs							
<i>R^r</i> > <i>R^r:mb</i> (0)	12	18	9	17	5	13	74
<i>R^r</i> = <i>R^r:mb</i> (1)	6	2	6	1	10	3	28
<i>R^r</i> < <i>R^r:mb</i> (2)	2	0	5	2	5	4	18
Total pairs	20	20	20	20	20	20	120

Mean scores for above

<i>R^r:mb</i>	.50	.10	.80	.25	1.00	.55	.53
-------------------------	-----	-----	-----	-----	------	-----	-----

Table 4. Color scores for *R^r:st r^g* and *R^rr^g* leaf sheaths

Experiment No.	I	II	III *	IV	Total pairs
First reader's scores					
No. seedling pairs					
<i>R^r</i> > <i>R^r:st</i> (0)	11	17	9	19	56
<i>R^r</i> = <i>R^r:st</i> (1)	4	4	12	5	25
<i>R^r</i> < <i>R^r:st</i> (2)	5	4	4	1	14
Total pairs	20	25	25	25	95
Mean scores for above					
<i>R^r:st</i>	.70	.48	.80	.28	.57
Second reader's scores					
No. seedling pairs					
<i>R^r</i> > <i>R^r:st</i> (0)	11	16	7	20	54
<i>R^r</i> = <i>R^r:st</i> (1)	5	5	17	2	29
<i>R^r</i> < <i>R^r:st</i> (2)	4	4	1	3	12
Total pairs	20	25	25	25	95

Mean scores for above

<i>R^r:st</i>	.65	.52	.76	.32	.57
-------------------------	-----	-----	-----	-----	-----

* Exceptional greenhouse temperature (see text).

that of $R^r:lst\ r^g$ in about 75% of the pairs formed, and was inferior in only about 8% of the cases. These results support the conclusion earlier stated that the effect on R^r of R^{lst} is more extreme than that of R^{st} .

Root color

Differences in average root pigmentation between standard $R^r\ r^g$ seedlings and $R^r:st\ r^g$ and $R^r:lst\ r^g$ test seedlings compared at 1, 2, and 3 days after exposure to light, were not found. $R^r:mb\ r^g$ seedlings were not evaluated in this respect. All three classes of seedling roots became extensively, but rather unevenly pigmented during the first 24 hours after exposure to light.

These results should not be taken as final, in our opinion. A definitive test of the effects of R^r , $R^r:st$, and $R^r:lst$ on root pigmentation awaits the development of a method of handling the seedlings whereby anthocyanin development in the tissues is more attenuated and more uniformly expressed in the tissue than was the case in the present experiments.

Glume and anther color

No attempt was made to score systematically the anthocyanin pigmentation of mature plants of the genotypes in question. An incidental

observation on glume and anther color, however, is meaningful. Plants resulting from pollinations in the immediately preceding generation of the W 23 ($r^g\ r^g$) inbred line by W 22 standard $R^r\ R^r$, $R^r\ R^{st}$, and $R^r\ R^{lst}$ individuals, were grown in the field at Madison, Wisconsin, in 1957. It was obvious at the flowering stage in these otherwise highly uniform families that the glumes and anthers of all the $R^r:st\ r^g$ and $R^r:lst\ r^g$ individuals were more weakly pigmented than were these structures in standard $R^r\ r^g$ plants grown in an adjacent row. The $R^r:st\ r^g$ and $R^r:lst\ r^g$ genotypes, however, could not be separated from each other on this basis.

The $R^r:st$ and $R^r:lst$ changes expressed in these F_1 plants arose in the respective $R^r\ R^{st}$ and $R^r\ R^{lst}$ parents. Their maintenance in the full-grown sporophytic offspring rules out the possibility that the seedling color effects reported in the present study are merely the result of diffusion of some product from the associated endosperm, which displays the same phenomenon, and to which, conceivably, the primary effects of $R^r:st$ and $R^r:lst$ might be limited.

Discussion

The methods used in rearing the seedlings carrying the altered forms of R^r were empirical. Various growing procedures were tried with a view to determining whether substitution of $R^r:st$, $R^r:lst$, or $R^r:mb$ for the standard R^r allele in

Table 5. Color scores for $R^r:lst\ r^g$ and $R^r\ r^g$ leaf sheaths

Experiment No.	I	II	III*	IV	Total pairs
First reader's scores					
No. seedling pairs					
$R^r > R^r:lst$ (0)	17	20	23	18	78
$R^r = R^r:lst$ (1)	2	2	2	2	8
$R^r < R^r:lst$ (2)	1	3	0	5	9
Total pairs	20	25	25	25	95
Mean scores for above					
$R^r:lst$	.20	.32	.08	.48	.27
Second reader's scores					
No. seedling pairs					
$R^r > R^r:lst$ (0)	14	20	20	16	70
$R^r = R^r:lst$ (1)	5	3	5	6	19
$R^r < R^r:lst$ (2)	1	2	0	3	6
Total pairs	20	25	25	25	95
Mean scores for above					
$R^r:lst$	.35	.28	.20	.48	.33

* Exceptional greenhouse temperature (see text).

R^rg heterozygotes changed the potential for anthocyanin formation in the young plant. Treatments were found under which *R^r:st r^g*, *R^r:lst r^g*, and *R^r:mb r^g* seedlings differed from *R^rr^g* seedlings with significant regularity in coleoptile and leaf sheath color. A corresponding difference in anthocyanin formation in the roots was not observed, although this result may mean nothing more than that a proper test was not discovered.

Different numerical results would have been observed had other temperature and light regimes been followed. *R^r* on W22 background, for example, forms only a little anthocyanin in the leaf sheaths under optimal conditions for seedling growth. It was the observation that pretreatment at 90° F for five days considerably increased pigmentation in the *R^rr^g* control that made it feasible to detect differential effects of *R^r:st* and *R^r:lst* on leaf sheath color. It is probable also that the particular methods adopted would not have proved discriminative with various other strains, since it is known that anthocyanin formation in vegetative tissues of maize is strongly conditioned by modifying genes, as well as by environmental conditions. The anther color associated with the *R^r* allele here used, for example, is deep red when on W22 background, but is reduced to pale pink when the same *R^r* allele is incorporated in WF9, an unrelated inbred line.

The observation that in field-grown W23 × W22 F₁ hybrids glume and anther color in *R^rr^g* plants regularly was darker than in their *R^r:st r^g* and *R^r:lst r^g* counterparts, in itself, is convincing evidence that *R^r:st* and *R^r:lst* alter anthocyanin formation in vegetative tissues. This fact also supports the conclusion that the differential color effects appearing in the seedlings, which alone were studied in detail, are autonomous rather than secondary manifestations of *R^r:st*, *R^r:lst*, and *R^r:mb* action in the accompanying endosperms.

Only a guarded inference can be drawn concerning the relative effects on endosperm and plant color of the genetic changes in *R^r* arising in stippled, light stippled, and marbled heterozygotes, because of the arbitrary conditions under which seedling pigmentation was observed. It may be significant, however, that the reducing effect of *R^r:lst* on coleoptile and leaf sheath color was found to be greater than that of *R^r:st* under the same experimental conditions. Preliminary evidence is at hand indicating that *R^r:lst* and *R^r:st* stand in the same order in terms of aleurone pigmentation also. This is the only bit of evidence at present available suggesting that the effects of these altered *R^r* alleles on seed and plant color are parallel.

The basis of the unusual genetic changes in *R^r* which take place regularly in stippled, light stippled, and marbled heterozygotes is unknown. The *R* locus alone may be involved, or a factor closely linked to *R^r* also may be implicated. What the present results prove is that the phenotypic changes associated with these modified forms of *R^r* are manifested in the plant as well as the seed. This finding excludes interpretations of the phenomenon in terms of action on genic elements conditioning aleurone color only, or plant color only. The data suggest that the compound *R^r* locus, as a whole, is affected.

Summary

The genetically changes forms of *R^r* arising regularly in maize plants heterozygous for the stippled, light stippled, and marbled alleles, and previously shown to influence aleurone color differentially, were found to affect coleoptile and

seedling leaf sheath color also. Failure to demonstrate corresponding differential effects on root pigmentation possibly was due to inadequacy of the testing procedure. Two of the modified forms of *R^r* were observed to reduce glume and anther color also. The experimental results imply that the *R* locus as a region is involved in the phenomenon.

Acknowledgments. The study was aided by grants from the Research Committee of the Graduate School, University of Wisconsin, of funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation and by a grant from the National Science Foundation. The writers wish to acknowledge also the able technical assistance of Dr. T. R. MERTENS and BRUCE ASHMAN.

Literature

BRINK, R. A.: A genetic change associated with the *R* locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* **41**, 872—899 (1956). — EMERSON, R. A.: The genetic relations of plant colors in maize. *Cornell University Agricult. Exp. Stat. Memoir* **39**, 1—156 (1921). — STADLER, L. J.: Spontaneous mutation in maize. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 49—63 (1951). — The gene. *Science (Lancaster, Pa.)* **120**, 811—819 (1954). — STADLER, L. J., and M. H. EMMERLING: Relation of unequal crossing over to the interdependence of *R^r* elements (P) and (S). *Genetics* **41**, 124—137 (1956). — STADLER, L. J., and M. G. NUFFER: Problems of gene structure. II. Separation of *R^r* elements (S) and (P) by unequal crossing over (Abst.) *Science (Lancaster, Pa.)* **117**, 471—472 (1953).

Dr. R. A. BRINK, Dept. of Genetics,
College of Agriculture, University of Wisconsin, Madison 6 / Wisconsin, USA

Biology Division, Oak Ridge National Laboratory*, Oak Ridge, Tennessee

SPERMATOGONIAL EXCHANGE INVOLVING THE X BUT NOT THE Y CHROMOSOME IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

By

DAN L. LINDSLEY

With 6 Figures in the Text

(Eingegangen am 2. September 1957)

Introduction

Most of what is known about the constitution of the proximal heterochromatin of the X chromosome has been derived from the manipulation of different X chromosome rearrangements having one heterochromatic break point. It should also be possible to make inferences as to the constitution of the heterochromatin from products of heterochromatic exchange. It seems likely that exchange between heterochromatic regions is not necessarily genetically homologous as is euchromatic exchange (LINDSLEY 1955b). If this is true, a larger array of recombinant types, and thus more information on constitution, is possible than one might expect from homologous exchange. Furthermore, a large array of heterochromatic recombinants should provide information on the process of heterochromatic exchange itself. What follows represents the detailed analysis, with respect to these points, of a number of heterochromatic recombinants.

In a preceding paper (LINDSLEY 1955b), recombinants were described that resulted from spermatogonial exchange between the Y chromosome and the heterochromatic region of the X chromosome that was shifted from its normal proximal position on the chromosome to a subterminal position by *In(1)sc⁸* (see Fig. 1). The recombinant X chromosomes were recognized by the fact that they had lost the distal uninverted euchromatic region of *In(1)sc⁸*, which is

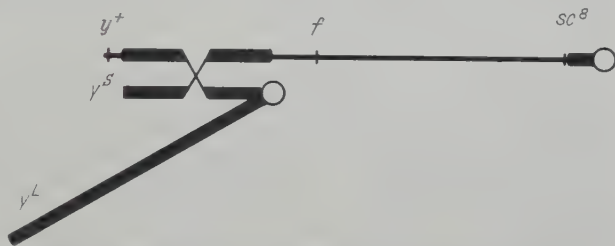


Fig. 1. Exchange between the distal heterochromatic segment of *In(1)sc⁸* and the short arm of the Y chromosome, believed by SIDOROV (1940, 1941) to be the event primarily responsible for the exceptional offspring of *In(1)sc⁸* males. (Heavy lines represent heterochromatin)

* Operated by Union Carbide Nuclear Company for the U.S. Atomic Energy Commission.

** Part of the material was presented to the Graduate School of the California Institute of Technology in partial fulfillment of requirements for the degree of Doctor of Philosophy supported by an Atomic Energy Commission predoctoral fellowship. Further experimentation has been pursued under a National Research Council postdoctoral fellowship at Princeton University and under a National Science Foundation postdoctoral fellowship at the University of Missouri. Experimentation was completed at Oak Ridge.

marked by the normal allele of *yellow*. In many of the recombinant X chromosomes studied, involvement of the Y chromosome could not be demonstrated. It is the purpose of this paper to examine the origin of these recombinants. It will be shown that many of them must have originated from exchange between the distally located heterochromatin and the proximally located heterochromatin of the same chromosome. Data that support previous contentions that heterochromatic exchange is not strictly homologous will also be presented.

Material

The crosses from which the recombinants to be studied were derived have been described in detail in the previous paper. Briefly, nine of 105067 X chromosomes examined from $\text{In}(1)\text{sc}^8$ males were recombinants (i.e., they had lost the distal uninverted euchromatic region marked by *y*); seven of these could be shown to have involved the Y chromosome. Thirty-three of 38588 X chromosomes examined from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ were recombinants; only two of 31 of these recombinants tested could be shown to have involved the Y chromosome. Since some of the recombinants included in these figures occurred as clusters of progeny from a single male (11 from one male, 5 from another, 4 from another, and 2 from each of two other males), the frequencies of Y involvement indicated are misleading, but it is clear that the frequency of recombination is greater in $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ than in $\text{In}(1)\text{sc}^8$. Considering each cluster as the result of a single event and including recombinants from sources other than the crosses mentioned above (including SIDOROV 1950), it can be said that of fifteen events indicated by recombinant X's recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^8$ males (sc^8 c.o. X's), twelve could be shown to have involved the Y chromosome. From twenty events indicated by recombinant X's recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ ($\text{sc}^{\text{SL}}\text{EN}$ c.o. X's), however, only four could be shown to have involved the Y chromosome. These figures represent a marked discrepancy in the proportion of Y involvement in recombinant X's recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$. The fact that the proximal heterochromatic regions of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ are much more extensive than those of $\text{In}(1)\text{sc}^8$ leads to the supposition that the frequency of recombination as well as proportion of recombinants not involving the Y chromosome may be a function of the amount of proximal heterochromatin and therefore of the amount of exchange involving proximal heterochromatin.

Prophase figures in larval neuroblasts provide information about the distribution of the major heterochromatic portions of the chromosome complement, since at this stage heterochromatic regions are much more condensed than the euchromatic regions. A normal X chromosome consists of a euchromatic region of varying cytological length, depending on how far prophase has advanced, and three terminal heterochromatic segments separated by two constrictions. The most terminal of the three is very small and is not detectable in most figures; it is separated from the other two segments by the primary or centric constriction, and is the right arm of the X (X^{R}). The remaining heterochromatic segments are much larger than X^{R} , each being slightly larger than the microchromosomes; these segments are separated by a secondary constriction that is the nucleolar constriction. It is generally believed that the *bb* locus is in the more distal (with respect to the centric constriction) of the larger heterochromatic segments.

The right break of $\text{In}(1)\text{sc}^8$ is in the more proximal of the two larger heterochromatic segments at a point so close to the primary constriction that all of the heterochromatin of the long arm of the X (X^{L}), except a portion about equal in size to X^{R} , is removed distally. The locus of *bb* and the nucleolar organizer lie in the region removed distally.

$\text{In}(1)\text{EN}$ arose in an as yet not understood manner through the opening out in inverted order of X^{c} (NOVITSKI 1949). The Y chromosome may have been involved in this event; however, the fertility factors of neither arm of the Y are detectable in this product, and it is difficult to envision Y involvement without concomitant recovery of one Y arm. The situation is further complicated by the fact that X^{c} was in turn derived from an attached X chromosome which most likely arose through successive exchange involving the X and Y chromosomes (MORGAN 1938). Although it is possible to study the heterochromatic regions of $\text{In}(1)\text{EN}$ cytologically, there is, therefore, little possibility of determining the origin of the various

heterochromatic regions. In prophase of larval neuroblasts the distal end of In(1)EN carries a single heterochromatic segment about equal in size to the fourth chromosome; proximally the EN inversion resembles the proximal end of a normal chromosome except in inverted order, i.e., with two large segments more terminal than a very small third segment. At anaphase the chromosome is decidedly two armed, and the short arm seems to consist of two segments of equal length. From this observation it has been concluded that the constriction in prophase that separates the very small segment from the two larger ones is the primary constriction; this conclusion assumes that the various constrictions maintain their identity throughout the mitotic cycle.

Cytologically, then, the long arms of In(1) sc^8 and In(1) sc^{8L} EN^R are very similar in that they have identical distal heterochromatin and extremely small proximal heterochromatic segments. The chief difference between these chromosomes resides in their short arms, In(1) sc^8 having an extremely minute segment (i.e., X^R) and In(1)EN having two rather large segments.

To test the composition of In(1)EN with respect to *bb*, complementary recombinants between In(1)EN and In(1) sc^{4L} , sc^{8R} (*bb*^{def} of GERSHENSON) have been studied in combination with *bb*¹ (*bb-lethal*). Essentially, it was found that In(1)EN/*bb*¹ is *bb*⁺ in phenotype, In(1) sc^{4L} ,EN^R/*bb*¹ is *bb* in phenotype, and In(1)EN^L, sc^{8R} /*bb*¹ is extreme *bb* in phenotype. In(1) sc^{4L} , sc^{8R} /*bb*¹ of course is lethal. It is apparent from the foregoing that In(1)EN carries a mutant allele of *bb* at either end and that when both are present a normal phenotype results. In(1) sc^{4L} ,EN^R is furthermore viable as an XO male indicating that everything necessary for survival lying to the right of the rightmost break of In(1) sc^4 is carried proximally on the In(1)EN chromosome.

Tests of Recombinant Chromosomes

Tests of chromosome sequence. Each recombinant X chromosome was made heterozygous to a normal sequence and to In(1) sc^8 , and recombination was measured; the markers *y*, *cv*, *v*, and occasionally *f* were used. Results of two types were observed; either recombination was normal indicating similarity in sequence between the recombinant and the test chromosome, or recombination was substantially reduced indicating a difference in sequence between the recombinant and the test chromosome.

With respect to these measurements the recombinant X chromosomes fall into three distinct classes. First and by far the most frequent are those that have retained their inverted sequence, i.e., those that crossover normally with In(1) sc^8 but not with the normal sequence. Second, there are those that crossover normally with a normal sequence but not with In(1) sc^8 ; these chromosomes are reinversions. The possibility of interpreting them as products of breakage of mitotic bridges will be discussed. Third, there are those chromosomes that crossover normally with neither a normal sequence nor with In(1) sc^8 ; these chromosomes have been interpreted as rings, and this interpretation has been confirmed by examination of larval neuroblast figures.

Tests for linkage with chromosome four. Evidence favoring pairing affinity between sex-linked heterochromatin and chromosome four has been thoroughly discussed by SANDLER and NOVITSKI (1956; see also LINDSLEY and SANDLER 1956). It was considered reasonable in view of the evidence that some of the recombinant X's, which did not involve the Y chromosome, might have arisen through exchange between the distal heterochromatin of the X and the proximal regions of chromosome 4. None of 34 recombinant X chromosomes tested for linkage with chromosome 4 were so linked; furthermore all the reciprocal recombinants, i.e., those carrying the distal uninverted euchromatic section of

In(1)sc⁸, were shown to involve the Y chromosome and consequently not the fourth.

Tests of heterochromatic constitution. It was considered desirable to determine as completely as possible the constitution of the distal heterochromatin of the inverted recombinant X chromosomes. Most recombinants derived from In(1)sc⁸L. EN^R carried the proximal heterochromatin of In(1)EN; since this region would be expected to interfere with genetic tests on the distal heterochromatin it was necessary to replace it with the proximal region of In(1)sc⁸. The proximal heterochromatin of In(1)sc⁸ is exactly complementary to the distal heterochromatin originally present, and should not interfere with the tests to be mentioned. Replacement of the proximal portion of In(1)EN involves removal of the loci of *y* and *ac*. This deficiency was covered in stock by sc⁸ · Y.

Since no heterochromatic markers were present in the cross from which the recombinants were recovered, the only useful criteria of heterochromatic constitution are duplication and deficiency; of these only deficiency is genetically detectable. A gross test for heterochromatic deficiency of the recombinant X's involved checking viability and phenotype of XO males carrying each recombinant X. Such males were obtained from the following cross: recombinant X/sc⁸ · Y ♂ X $\widehat{XX}$ *y*² *su-w*^a *w*^a *bb*/O; Dp(1;3)sc^{J-4}♀. Dp(1;3)sc^{J-4} consists of the tip of the X chromosome, through the locus of *sc*, carried on the tip of 3L and covers the deficiency for this region in the recombinant X's.

Of twenty recombinant X's tested as XO males, five (25b, J-3, K-1, S-7, W-0) were inviable (one or two extreme *bb* XO males were recovered from K-1). Although recovery of XO progeny from most of the remaining recombinant X/sc⁸ · Y males was reduced to some degree, it was nevertheless concluded that these recombinants were not demonstrably deficient. In order to learn more specifically the extent of deficiency in the XO lethal recombinants, we made each heterozygous to *bb*¹ and to In(1)sc^{4L}, sc^{8R} and checked for viability and phenotype. Of the five recombinants tested, three were lethal and presumably deficient for *bb* [K-1, S-7, and W-0 (one or two S-7/*bb*¹ females survived and were extreme *bb*)], and two were *bb* (25b and J-3).

Finally, it is known that the heterochromatic constitution of a chromosome may profoundly influence its segregation properties (GERSHENSON 1934; SANDLER and BRAVER 1954) in such a way that a male carrying an X chromosome lacking a major portion of the proximal heterochromatin [In(1)sc^{4L}, sc^{8R}] is characterized by high nondisjunction of the X and Y chromosomes and unequal recovery of reciprocal products of the first meiotic division. Consequently, segregation data from several of the recombinant X chromosomes (D-8, K-1, S-7, W-0, and 99c) were examined with this point in mind. In no case was there any evidence of increased nondisjunction of X and Y or of unequal recovery of reciprocal products of the first meiotic division.

Cytological examination. Each recombinant was studied in neuroblast pro-phases in an attempt to discover any changes in the distal heterochromatic configuration accompanying loss of *y*⁺. It will be recalled that the distal heterochromatin consists of two large segments separated by the secondary or nucleolar constriction. Eight of seventeen recombinant X chromosomes examined that had retained their inverted sequence, were found to have retained the morphology

of the original chromosome (99c, C-4, C-13, D-6a-d, F-7a-d, O-7, 52k3, and 53c10). These eight were among the recombinants that survived as XO males. Five others had retained a proximal segment but lost a portion of the distal segment. One (Q-1) had lost about one-half of the distal segment and was viable as an XO male; the others (B-1, C-6, D-8 and J-3) had lost all but an extremely minute portion of the distal heterochromatic segment. Finally, four (25b, K-1, S-7, W-0) lacked the distal segment in its entirety but had retained a proximal segment of apparently normal or nearly normal size. These four were inviable as XO males as was recombinant J-3. The reinverted recombinants carried no detectable heterochromatin distally, and the ring recombinants carried three adjacent heterochromatic segments.

The information on the constitution of the recombinants is summarized in Table 1.

Table 1. *A summary of the genetic and cytological information gathered for the recombinant X chromosomes*
The column of cytological information figures the more proximal of the distal heterochromatic segments on the right and the more distal on the left

Source	Recombinant	Normal recombination with		Viability and phenotype in combination with			Cytological constitution of the distal heterochromatin
		+	sc ⁸	0	bb ¹	sc ⁴ sc ⁸	
sc ⁸	25b	—	+	lethal	bb	bb	
	99c	—	+	+			
sc ⁸ EN	B-1	—	+	+			
	C-1 a-k	—	—	+			
	C-4	—	+	+			
	C-6	—	+	+			
	C-13	—	+	+			
	D-6a-d	—	+	+			
	D-8	—	+	+			
	F-7a-d	—	+	+			
	F-7e	+	—	+			
	I-7	+	—	+			
	J-3	—	+	lethal	bb	bb	
	K-1	—	+	bb ^{ext}	lethal	lethal	
	O-7	—	+	+			
	Q-1	—	+	+			
	S-7	—	+	lethal	lethal	lethal	
	W-0	—	+	lethal	lethal	lethal	
	52k3	—	+	+			
	53c10	—	+	+			

Possible Modes of Origin of Recombinants

In the preceding section of this report detailed genetic and cytological information on the recombinant X chromosomes has been presented. It is now of interest to utilize this information in attempting to deduce the origin of the recombinants. This attempt will be prefaced by a consideration of the consequences of the possible types of pairing and exchange between the proximal and distal heterochromatin of In(1)sc⁸ or In(1)sc⁸L, EN^R (Figs. 2, 3).

Each exchange figured is described with respect to three conditions, two of which refer to the pairing configuration and one to the strands involved.

1. The distal heterochromatic segment may pair with either of two proximal segments, the proximal heterochromatin of the long arm (Fig. 2), or the short arm (Fig. 3). As pointed out, the proximal heterochromatin of the long arm of both In(1)sc⁸ and In(1)sc⁸L, EN^R is exceedingly small in neuroblast prophases as is the short arm of In(1)sc⁸. Consequently, exchange involving these regions is expected to be rare if prophase length provides a reliable measure of genetic length. Since the short arm of In(1)EN(=EN^S) is much more extensive than

the short arm of $\text{In}(1)\text{sc}^8 (=X^R)$, one might expect the exchange frequency of the former to exceed that of the latter. That EN^S may undergo exchange is demonstrated by two observations: the first is the recovery from $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}$, EN^R of attached X 's, which presumably arose through exchange between the short arm of one chromatid and the proximal heterochromatin of its sister (LINDSLEY

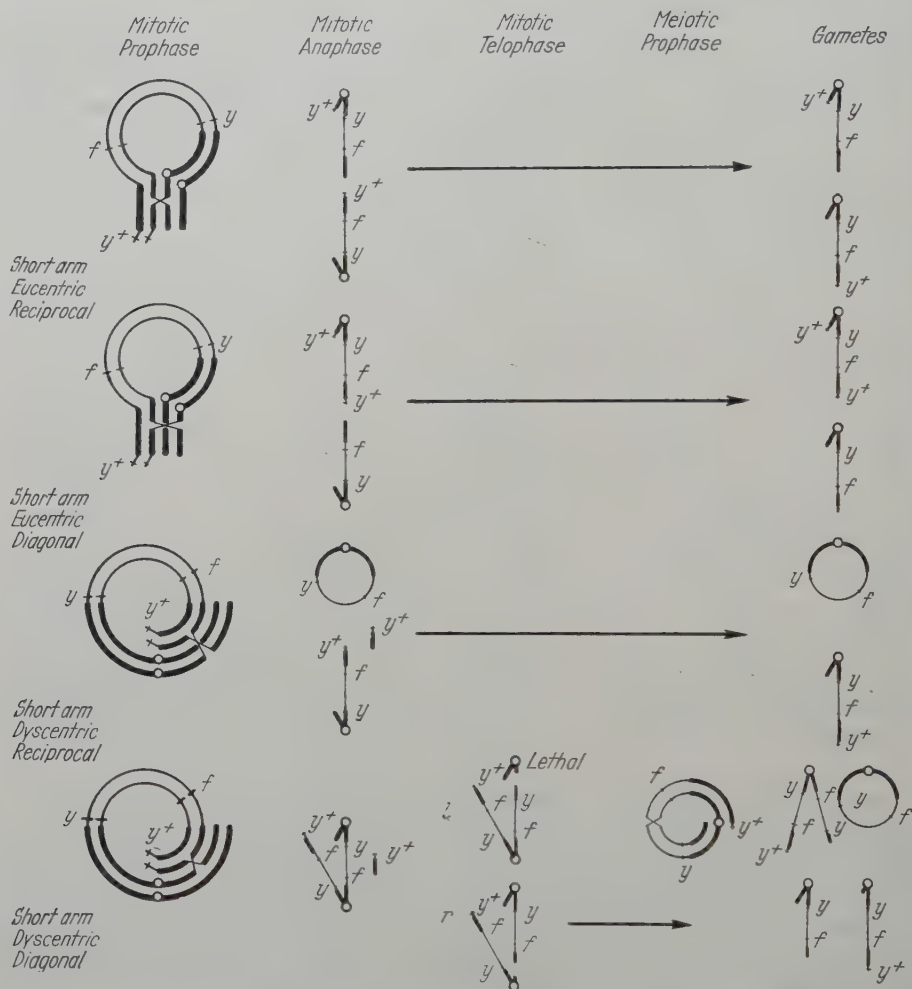


Fig. 2. Genetic consequences of exchange after different pairing configurations between the distal heterochromatic segment and the proximal heterochromatin of $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}$, EN^R or $\text{In}(1)\text{sc}^8$. (Heavy lines represent heterochromatin)

1950), and the second is the recovery of ring chromosomes from $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}$, EN^R males. That the proximal heterochromatin of the long arm and X^R of $\text{In}(1)\text{sc}^8$ may undergo exchange may be indicated by the spontaneous attachment of M-5 chromosomes (LINDSLEY 1950).

2. The terms dyscentric and eucentric as used in Figs. 2 and 3 have been defined by LINDSLEY (1955b). Briefly, if, when two heterochromatic segments

pair, the regions of each segment nearest to the centromere are paired as are the regions more remote from the centromere, the pairing and any subsequent exchange are eucentric. If the region closest to the centromere of one segment is paired with the more remote region of the other, pairing and exchange are dyscentric.

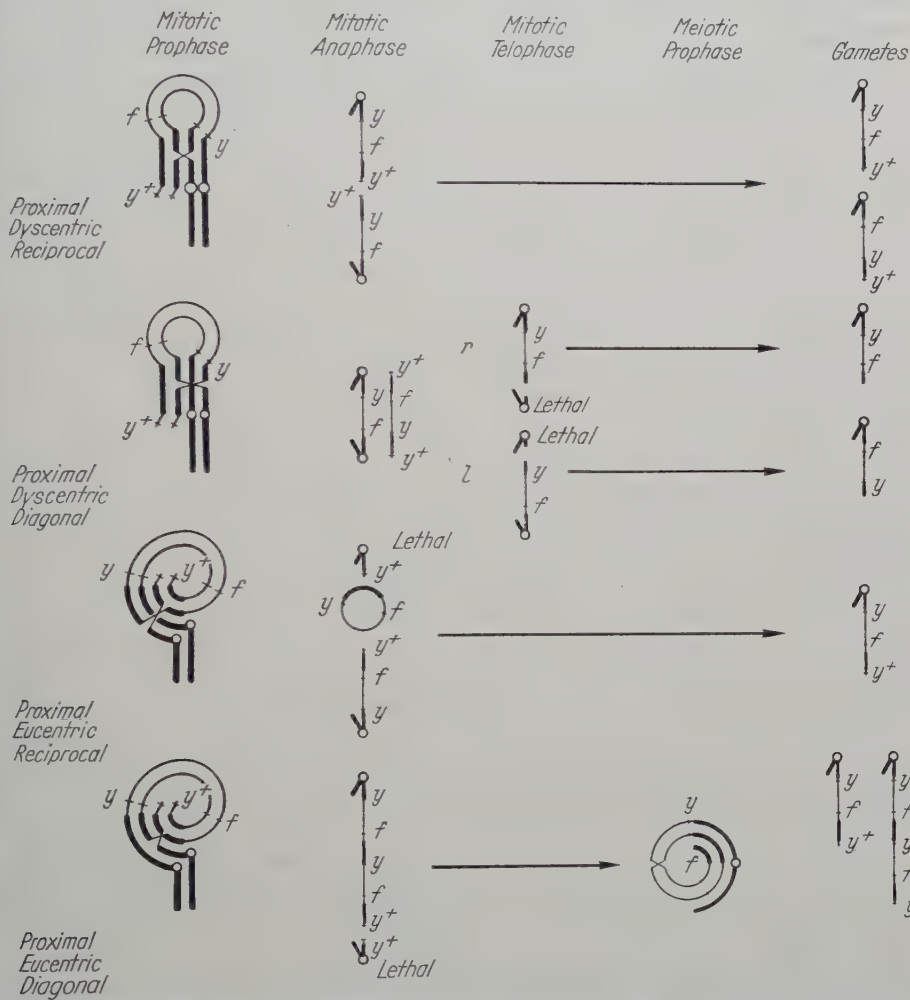


Fig. 3. Genetic consequences of exchange after different pairing configurations between the distal heterochromatic segment and the short arm of *In(1)sc^L*, *EN^R* or *In(1)sc^S*. (Heavy lines represent heterochromatin)

3. The terms used to designate the strands involved in exchange are borrowed from the literature on attached-X chromosomes; an exchange is reciprocal when the strands involved are attached to the same centromere and nonreciprocal or diagonal when they are attached to sister centromeres.

As pointed out by STERN ((1936), when one chromatid of each of two mitotic chromosomes becomes involved in an exchange, centromeres of each chromosome separate equatorially and independently with the result that the two crossover

chromatids may go to the same pole or one crossover chromatid may go to each pole. In the present case, however, the two chromatids of the same chromosome are involved in the exchange, and equational separation occurs in only one way with noncrossover Y's separating normally and centromeres of the X separating.

Beginning with the top of Fig. 2, each configuration will be considered briefly in its turn. Dyscentric pairing of the distal heterochromatic segment with the proximal heterochromatic segment followed by reciprocal exchange results in a reinversion of the interstitial euchromatic region of one chromatid of the pair. No loss of y^+ occurs, however, and such an event is undetectable. A diagonal crossover in place of the reciprocal exchange, however, results in the formation of a dicentric chromatid. (As stated, certain recombinants may be interpreted as the products of fragmentation of chromatid bridges; only heterochromatic rupture will be considered since the products of euchromatic breakage give rise to gonial cells that, if they were themselves viable, would in the vast majority of cases fail to give rise to viable zygotes.) This dicentric forms a bridge at the ensuing anaphase that may break in the heterochromatin either to the right of f (r) or to the left of y (l); in the first case a recombinant that has retained its inverted sequence is produced, whereas in the second a reinverted recombinant X is produced.

Eucentric pairing between the distal and proximal heterochromatin followed by reciprocal exchange results in no viable recombinants, since the products are an acentric ring, which is not expected to become included in the daughter nucleus, and a small heterochromatic X fragment, which becomes included in an essentially nullo-X cell that should fail to multiply. Diagonal exchange after the above pairing configuration, however, results in a tandem acrocentric compound-X chromosome (terminology of NOVITSKI 1954) and a small heterochromatic fragment like the one produced by reciprocal exchange. The compound passes, together with a Y chromosome, to one daughter nucleus. Evidence that cells of the composition $2X:2A$ arising in a testis are able to proceed through spermatogenesis has been presented in the earlier paper (LINDSLEY 1955b). Does the mere fact that such cells are genetically female allow their chromosomes to undergo meiotic crossing over? It can be seen in Fig. 2 that a reciprocal meiotic exchange would result in an apparent nonrecombinant X and an acentric ring. A diagonal crossover would have no observable consequence (not shown because four-strand stage is not depicted). No evidence of tandem acrocentric compounds arising from these crosses has been obtained.

Eucentric pairing between the distal heterochromatin and the short arm accompanied by reciprocal exchange results in the interchange of tips of the two arms of one of the chromatids. No loss of y^+ occurs; consequently this event is undetectable. Diagonal exchange within the same configuration effects the transposition of y^+ from the long arm of one chromatid to the short arm of its sister. The separating chromatids, then, are a chromosome with the left end (y^+) of $In(1)sc^8$ located on the distal end of each arm (undetectable), and a recombinant X chromosome. Such a recombinant X carries a portion of the short arm in place of the $In(1)sc^8$, y^+ tip.

Dyscentric pairing between the distal heterochromatin and the short arm and then reciprocal exchange yields a nonrecombinant and a ring from which y^+ has

been lost as an acentric fragment. Finally, diagonal exchange forms a dicentric chromatid, which, when it breaks to the right of f results in one product that cannot be distinguished from a nonrecombinant and one recombinant X, and when it breaks to the left of y results in one nullo-X cell and one carrying a tandem metacentric compound-X chromosome. If meiotic crossing over may occur in 2X:2A primary spermatocytes, ring X-bearing gametes should be recovered in addition to the compound X gametes. It will be noticed that fragmentation somewhere in the euchromatic portion of the bridge will result in the passage to one pole of a complete X chromosome plus a portion of the normal right end of the X, the size of which depends on the point of breakage. No change in markers would result, however, if the break were near the f end of the bridge, and such flies would have to be recognized by symptoms of duplication in males; if such males were detected, they would most likely be sterile. If the bridge were to break near the y end, a tandem metacentric compound-X deficient for the tip of the arm in normal sequence would result. Breaks in the middle of the bridge should yield inviable combinations to each pole.

The recombinant X chromosomes fall into three classes with respect to sequence; two of these types are recoverable from more than one event shown in Figs. 2 and 3. Consider first the reinverted recombinants: The hypothesis that simultaneous loss of y^- and reinversion of the original inverted sequence comes about as the result of fragmentation of an anaphase bridge is the most reasonable on that presents itself. It is possible to construct schemes involving double exchange that can give rise to such products, but double exchange should be exceedingly rare, and these events fail to account adequately for cluster F-7, which consists of four recombinants with inverted sequence and one reinverted recombinant. It should be pointed out, however, that cluster F-7 was derived from an experiment in which 17 of 430 males (1/25.3) produced recombinant progeny; consequently, it would not be surprising if an additional exchange event had occurred in one of the 17 males. In addition to the two reinverted recombinants reported here, SIDOROV (1940) reported that many of the cases of loss of y^+ recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^8 \cdot \text{X} \cdot \text{Y}^{\text{L}}$ heterozygotes are accompanied by simultaneous reinversion of $\text{In}(1)\text{sc}^8$. Bridge breakage could account for this observation, since all exchanges, heterochromatic and euchromatic, within the inverted region give rise to a dicentric chromatid. Furthermore, observations of STERN (1936) on hypodermal spots in ring/normal and inversion/normal heterozygotes provide evidence favoring rupture of mitotic dicentrics. If bridge breakage is postulated to account for reinverted recombinants, the first question posed by the recovery of such a recombinant concerns the origin of the second centromere necessary for bridge formation. A logical source is the Y chromosome; but, as established in the earlier paper, a reinversion recovered from a dicentric in which the Y chromosome had participated would carry a complete Y arm that is genetically detectable, and neither reinverted recombinant was so constituted. A second possible source of the second centromere is the sister chromatid as shown in Fig. 2. In this case, the reinversions should carry the centromere region of $\text{In}(1)\text{EN}$ including the short arm. Careful cytological examination of the reinverted recombinants fails to reveal the presence of a second arm in either case. The proximal heterochromatin of these chromosomes consists of two segments that may be slightly more

extensive than those at the base of a normal X. If these recombinants did actually originate through bridge breakage, dicentric formation must have involved an essentially telocentric element; the only such element in the complement in which these recombinants arose was chromosome 4. The possibility of exchange between sex-linked heterochromatin and chromosome 4 has been alluded to earlier in this

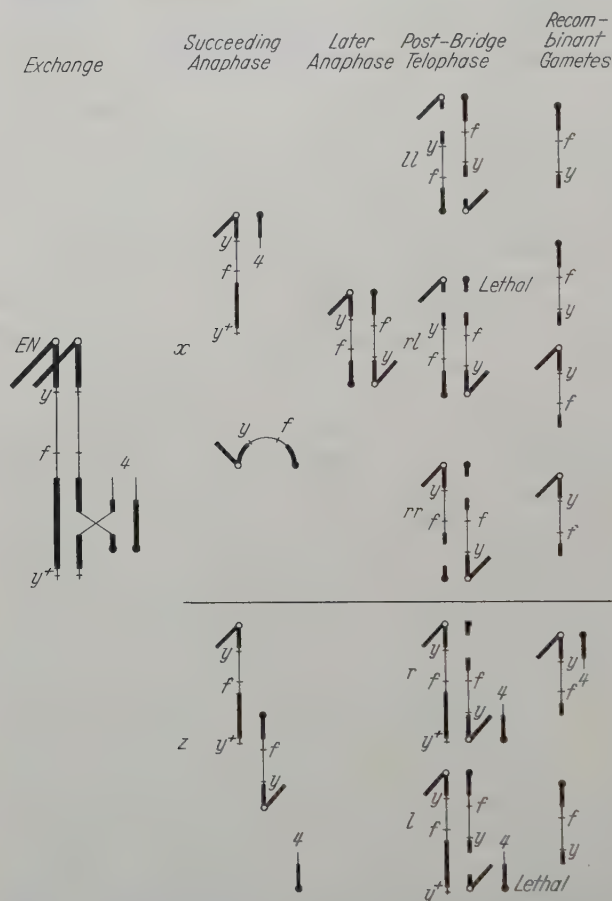


Fig. 4. Genetic consequences of dyscentric exchange between the distal heterochromatin of *In(1)sc^L*, *EN^R* and the fourth chromosome

1936). The results of dyscentric exchange between the distal heterochromatin of *In(1)sc^L*, *EN^R* and the proximal heterochromatin of chromosome 4 are diagrammed in Fig. 4. It is assumed that the Y chromosome and the uninvolved 4 separate normally, each sending a chromatid to each pole, and these chromosomes are not included in the figure. The exchange results in the formation of a bridge with centromeres derived from *In(1)EN* and chromosome 4 and an acentric fragment consisting principally of the euchromatic portion of chromosome 4. One of the daughters of a cell in which such an exchange has occurred will be haplo-4, owing to loss of the acentric piece. *x* segregation results in the passage to one pole of the nonrecombinant X and fourth chromatids, which need not be further considered, and to the other pole the intact bridge. The latter cell will be haplo-4, and half of the gametes ultimately recovered from it will be nullo-4. During the ensuing mitosis, the dicentric replicates and sister centromeres separate, those at one end of the dicentric presumably separating independently of

paper. Chromosome 4 at prophase consists of a small heterochromatic segment and nothing more. One can visualize dyscentric exchange between chromosome 4 and the distal heterochromatin of *In(1)sc^L* resulting in formation of a dicentric that is morphologically very similar at the fourth centromere end to the centric region of a normal X, and that carries the centric region of *In(1)EN* at the other end (i.e., to the left of *y*). What follows is a parenthetical consideration of the possible consequences of formation of such a dicentric chromatid.

Mitotic exchange between two chromosomes is followed by equational separation of the chromatids of each chromosome; this may occur in such a way that reciprocal exchange products proceed to the same (*x* segregation) or opposite (*z* segregation) poles (STERN

those at the other. This being the case, two bridges may be formed as shown in Fig. 4 or one dicentric may proceed, either freely or interlocked with its sister, to either pole. Each dicentric that survives a given mitotic division intact is again subjected to the possibility of bridge formation in the succeeding division. Both the bridges thus formed could break to the right of f (rr) yielding an inverted recombinant and a small telocentric heterochromatic fragment to each pole. Both bridges could break to the left of y (11), in which case a re-inverted telocentric recombinant and a metacentric heterochromatic fragment passes to each pole. Rupture of one chromatid to the right of f and the other to the left of y ($r1$) results in the passage of both heterochromatic fragments mentioned to one pole, yielding a nullo-X and therefore lethal cell, and of both types of recombinants to the other pole, yielding a 2X:2A cell that can ultimately give rise to inverted recombinant- and reinverted recombinant-bearing gametes. Cluster F-7 could have arisen from such a cell, but to have done so, both chromatid and chromosome fusion (McCLINTOCK 1941, 1942) must have failed to occur. x segregation results in the immediate formation of a bridge. If the bridge ruptures to the right of f , the nonrecombinant X passes together with an acrocentric heterochromatic fragment to the haplo-4 pole, and an inverted recombinant passes together with the nonrecombinant 4 to the diplo-4 pole; this is the only case where a recombinant X passes to the diplo-4 pole. If the bridge ruptures to the left of y , a reinverted acrocentric recombinant passes together with the nonrecombinant X chromatid to the haplo-4 pole forming a 2X:2A cell, whereas a metacentric fragment passes together with the nonrecombinant 4 chromatid to the diplo-4 pole forming a nullo-X cell. Recombinant I-7 could have been derived from such a 2X:2A cell, if chromatid fusion had failed to occur, as well as from cells formed by x segregation and 11 or $r1$ rupture. It should be emphasized that the reinverted recombinants are invariably derived from haplo-4 gonias that may suffer decreased fertility, especially in competition with normal cells, and furthermore that half the zygotes fertilized by gametes derived from haplo-4 cells should themselves be haplo-4 and therefore extremely inviable. The probability of recovering a reinverted recombinant would be further decreased if the probability of rupture were correlated with the amount of heterochromatin to the left of y and to the right of f , since to the left of y is the minute proximal heterochromatic segment of $In(1)EN$, and to the right of f is some recombined combination of the extensive distal heterochromatin of $In(1)sc^8$ and the proximal heterochromatin of chromosome 4.

Consider now the products of fragmentation to the left of y (i.e., 1 fragmentation) of the bridge shown in Fig. 4 and how they might be expected to differ from a normal X. Breakage within the heterochromatin might be expected to leave a small heterochromatic segment distally; such a segment was not detectable in mitotic prophase nor by a tendency for the terminal regions of either reinversion to pair with the chromocenter in polytene preparations. This is not too surprising since the amount of heterochromatin within the bridge at the y end is minute. As pointed out previously, $In(1)EN$ resulted from the opening out of X^c ; according to SCHULZ and CATCHESIDE (1937), X^c lacks all the salivary gland chromosome bands of region 1A (1A1 to 1A6). The reinversions, if they carry the y region of $In(1)EN$ must also lack these bands, although they may possibly carry in their place a few heterochromatic bands, which would be undetectable as terminal heterochromatin by the criteria cited. A careful comparison of the terminal bands of polytene X chromosomes of females of constitution y/y , y/sc^8EN c.o. F-7e, and y/sc^8EN c.o. I-7 reveals no difference between the y chromosome and recombinants F-7e and I-7. In no case were bands 1A1 to 1A4 seen.

The second group of recombinants to be considered will be the rings. The eleven ring recombinants were recovered among the progeny of a single $In(1)sc^8, EN$ male. These rings could have arisen in two ways from dyscentric exchange between the short arm of $In(1)EN$ and the distal sc^8 heterochromatin. Reciprocal exchange gives rise simply and directly to rings. Diagonal exchange, on the other

hand, can only give rise to rings after a complicated series of events, including meiotic exchange between the arms of a tandem metacentric compound-X chromosome during spermatogenesis. Recovery of eleven rings from one mating is best explained by reciprocal exchange, since such results from diagonal exchange would indicate recovery of eleven crossover chromatids and no noncrossover chromatids and from a male.

The third class of recombinant X chromosomes is the type most frequently recovered—that in which there is no change in sequence; this type is also recoverable from more than one event shown in Figs. 2 and 3. Consider first events which might contribute similarly to this class of recombinants in both $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ experiments. Rupture of the bridge resulting from diagonal exchange after dyscentric pairing between the tip and the proximal heterochromatin is such an event. For every bridge thus formed that undergoes heterochromatic rupture the type of product expected depends on the relative probability that rupture will occur at one end or the other of the bridge. This probability may depend among other things on the relative lengths of heterochromatin at either end included within the bridge. As can be seen in Fig. 2, the heterochromatic material included within the y or sc^8 end of the bridge consists of the unaltered proximal heterochromatin of the long arms of $\text{In}(1)\text{EN}$ and $\text{In}(1)\text{sc}^8$ respectively. As pointed out previously this region, in mitotic prophase at least, is extremely short in both cases. The heterochromatin of the f end of a bridge formed by either $\text{In}(1)\text{sc}^8$ or $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ consists of a combination of the distal heterochromatin of $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and the proximal heterochromatin mentioned above; the extent of this composite region depends, of course, on the point exchange. Since the distal sc^8 heterochromatin is relatively extensive, most exchanges should result in a region more extensive than that found at the opposite end of the bridge. Consequently, one might expect such bridges to fragment more often at the f end resulting in the product under discussion than at the y or sc^8 end. If the block hypothesis of heterochromatin of MULLER et al. (1937) is valid, however, and if blocks are manifest in prophase, one might expect no proportionality to exist between prophase length and bridge breakability (see Discussion). Breakage at the y or sc^8 end yields a unique product, i.e., a reinversion, and this product provides a minimum measure of the contribution of such bridges to the class of recombinants under consideration. As pointed out previously, however, no reinverted recombinants of the proper morphology have been recovered, indicating that the contribution of bridge breakage to the inverted recombinant class is probably relatively unimportant. One reason for this may be the very short region available for exchange proximally.

The possibility that some of the inverted sc^8 and sc^8EN recombinants derive from the rupture of a bridge formed by dyscentric exchange between the distal X heterochromatin and the Y chromosome or autosomal heterochromatin should be briefly considered. The results of dyscentric exchange with a Y chromosome have been fully discussed in the earlier paper. Suffice it to say that some of the inverted recombinants could have come from this source and that a minimum measure of the contribution of this source is derived from reinverted recombinants with a Y arm proximally, of which none were recovered. The consequences of dyscentric exchange between the distal heterochromatin of $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and the proxi-

mal heterochromatin of an autosome have been adequately diagrammed for chromosome 4 in Fig. 4. The essential points are that the exchange produces as an acentric fragment one autosomal euchromatic arm and that segregation generally produces a recombinant X-bearing cell that is haploid for the synaptic autosomal arm and that will consequently die except when chromosome 4 is involved. However, *z* segregation and *r* rupture produces a euploid cell with an inverted recombinant. Some estimate, and probably an underestimate, of the contribution of dyscentric exchange with autosomes to the inverted recombinant class is provided by the two reinversions already thoroughly discussed.

Sister-strand union (SANDLER 1954a) in the distal heterochromatin could produce a bridge that, if it ruptured medially, would yield an inverted recombinant to each pole. This phenomenon, as with those described, must, if it occurs at all, be rare. This is because the events thus far considered contribute similarly to $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ recombination; therefore, Y independent $\text{In}(1)\text{sc}^8$ recombination (2 105 000) provides an estimate of their total contribution.

The two remaining sources of inverted recombinants involve exchange between the distal heterochromatin and the short arm. Since the essential difference between $\text{In}(1)\text{sc}^8$ and $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ lies in the much greater length of the short arm of the latter, it is here that the contribution to the great excess of recombinants recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ must be sought.

Diagonal exchange after eucentric pairing between distal heterochromatin and the short arm heterochromatin results in the replacement of y^+ and ac^+ at the tip of one chromatid with a portion of the short arm of its sister; it is hypothesized that this event is responsible for the bulk of the recombinants of the inverted type, and particularly for the large excess of recombinants recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{EN}^R$ as compared with $\text{In}(1)\text{sc}^8$. Dyscentric pairing between distal heterochromatin and the short arm with subsequent diagonal exchange results in the formation of a bridge that yields the inverted recombinant class following rupture to the right of *f*. An indication that this event is of negligible importance is the observation of only one case of ring formation. For any given pairing configuration, one might expect reciprocal and diagonal exchange to be equally likely; reciprocal exchange in place of the diagonal exchange giving rise to the bridge just discussed yields a ring chromosome. Furthermore, if SCHWARTZ (1954) is correct in postulating that somatic exchange preferentially involves newly formed chromatids (i.e., reciprocal exchange), ring formation provides a maximum estimate of dyscentric exchange between distal and short arm heterochromatin.

Considering that only two recombinants that did not demonstrably involve the Y chromosome were recovered from 105 000 sc^8 chromosomes examined, one is justified in discussing all the inverted sc^8, EN recombinant X's in terms of exchange between the distal heterochromatin and the short arm. Furthermore, the low incidence of ring formation renders consideration of exclusively eucentric exchange a safe procedure. Consequently, an attempt will be made to correlate the information presented earlier on the heterochromatic constitution of the inverted recombinants with their origin through eucentric exchange between the distal heterochromatin and the short arm. In the previous paper, the question of homologous versus nonhomologous heterochromatic exchange was discussed in detail,

and a formal scheme for differentiating between the two possibilities was proposed. Briefly, the argument states that if two homologous heterochromatic regions pair and exchange, the point of exchange can influence the distribution of material within the region, but all recombinants are identical with respect to the chromatin outside the region of homology. Furthermore, every recombinant carries intact one homologous region; any duplication or deficiency resulting from exchange is therefore the consequence of exchange of material outside the region of homology. Said in another way, exchange within a given homologous region yields recombinants which are identically duplicate-deficient; conversely,

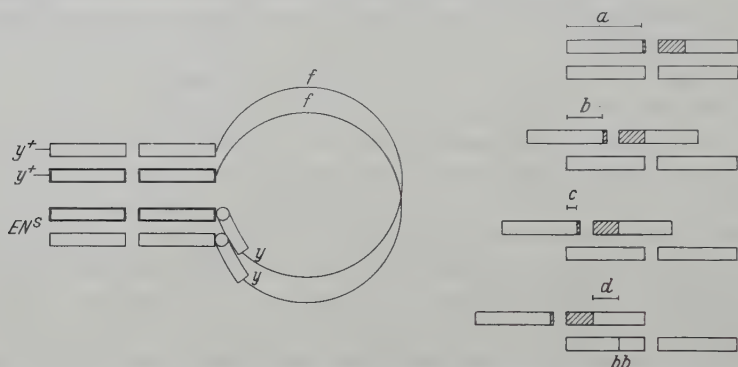


Fig. 5. Pairing relations and regions of exchange between the distal heterochromatin and the short arm of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{sL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ postulated to account for the bulk of the recombinant X chromosomes recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{sL}}, \text{EN}^{\text{R}}$. The region of exchange inferred from the cytogenetic constitution of recombinants is indicated by the lettered line above each configuration. The region drawn in boldface indicates the portion of the entire eucentric short arm configuration represented in the rest of the diagram. The crosshatched region denotes the limits of the segment of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{sL}}$ which may contain bb^+ .

each different type of duplicate-deficient recombinant defines a different homologous region (region of uninterrupted eucentric homology = UEH region).

Cytologically there are four classes of recombinants, some of which are further subdivided on the basis of the genetic data. Fig. 5 attempts to account for all the inverted recombinants while postulating a minimum number of UEH regions, i.e., while maximizing the agreement of the observations with homologous exchange. This is done by judicious placement of the regions of exchange and of the bb allele present on EN^{S} . The position of bb^+ on the X is restricted by the knowledge that it lies between the right breaks of $\text{In}(1)\text{w}^{\text{m4}}$, which is about midway in the more distal (in a normal sequence) of the two larger proximal heterochromatic segments and $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{L8}}$ which is immediately proximal to the secondary constriction (LINDSLEY 1954). It will be noticed that the exchanges postulated do not require the participation of the proximal segment of the short arm of $\text{In}(1)\text{EN}$; this could indicate that this segment has a relatively short genetic length or that the cytological observations are in error, and it is on the other side of the centromere or absent altogether.

$\text{In}(1)\text{sc}^{\text{sL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ recombinants C-4, C-13, D-6, F-7 a-d, O-7, 52k3, and 53c10 contain two heterochromatic segments of equal size distally and could represent products of exchange following pairing according to Fig. 5a. An alternative possible origin of F-7 a-d has been discussed earlier. Since each of these recombinants carries bb^+ distally, the site of exchange is restricted to the region distal to bb^+ .

This may be simply a consequence of the previous observation that the proximal segment of EN^S seems not to participate in exchange. Recombinant Q-1 carries 1.5 heterochromatic segments distally, the more distal being about half the size of the more proximal; it also carries bb^+ distally. Fig. 5b would account for this recombinant. Recombinants B-1, C-6, and D-8, which have lost all but a minute portion of the more distal of the two distal heterochromatic segments and have retained bb^+ , could have originated according to Fig. 5c. Recombinant J-3 is cytologically similar to recombinants B-1, C-6, and D-8, but it carries a mutant allele of bb . It also seems to be deficient for some factor necessary for survival. This factor must be carried by $In(1)sc^{4L}, sc^{8R}, bb^1$, and the Y chromosome, since J-3 is inviable as an XO male but survives in the presence of these three chromosomes. If $In(1)sc^{4L}, sc^{8R}$ carries the region for which J-3 is deficient, then the factor must normally reside in the portion of the distal heterochromatin that is common to $In(1)sc^4$ and $In(1)sc^8$. Consequently, the extreme proximal part of the distal heterochromatin of $In(1)sc^8$ must carry the locus of the viability factor. sc^8 recombinant 25b is identical to J-3 in constitution, and yet it was derived from $In(1)sc^8$; the possibility exists therefore that J-3 originated in the same manner as 25b and therefore did not involve EN^S . The origin of 25b is puzzling since it carries a mutant allele of bb , and yet was derived from a genotype in which there was no known mutant allele of bb except possibly on Y^L . Finally, recombinants K-1, S-7 and W-0 carry a single distal heterochromatic segment and are probably deficient for bb , since they are inviable in combination with bb^1 . Their origin could have been exchange between bb^- of $In(1)sc^8$ and bb of EN^S according to 5d.

The inverted $In(1)sc^{8L}, EN^R$ recombinants then fall into four distinguishable cytological classes, each of which implies the presence of a UEH region between the distal heterochromatin of $In(1)sc^8$ and EN^S . To these four is added a fifth indicated by the one case of ring formation recorded, C-1, and possibly a sixth if recombinant J-3 arose by exchange involving EN^S . As pointed out previously (LINDSLEY 1955b), as the number of postulated UEH regions in an extremely restricted region becomes large, the case for homologous exchange becomes less likely than that for nonhomologous exchange. The above recombinants are considered to support the hypothesis that heterochromatic exchange is nonhomologous. An array of pairing sites (GERSHENSON 1940) or collochores (COOPER 1951) on one heterochromatic segment, any one of which may pair with any of a similar array on another segment could provide a basis for the type of nonhomologous but heterochromatin specific exchange postulated, as an alternative to homologous exchange, to account for observations of the type presented in this and in the earlier report. The unequal recovery of products of dyscentric and eucentric exchange may indicate that, although nonhomologous, heterochromatic exchange may also be nonrandom. It is possible, however, that nonrandom strand involvement contributes to this inequality, since a dyscentric exchange that yields a recognizable recombinant is more likely to be reciprocal than diagonal, whereas only diagonal eucentric exchange yields a recognizable recombinant.

Discussion

Throughout the preceding portion of this report cytological lengths, i.e., mitotic prophase lengths, have been accepted at face value with few reservations;

this is certainly an oversimplification. There is ample evidence for noncorrespondence of cytological length and genetic length of the proximal heterochromatin, whether the latter is measured by recombination, disjunction, or induced rearrangement. A case in point would be the observation of SANDLER (1954b) that of the two arms of a heterochromatic element with grossly unequal arm lengths (i.e., FR 2, which cytologically is practically a rod) the shorter was the participant in exchange with a reversed acrocentric compound-X chromosome in 16 of 16 detachments examined. Furthermore, similar observations on detachments of a reversed acrocentric with a normal Y (LINDSLEY 1955b) and on sc^8 crossovers involving the Y (LINDSLEY 1955a) show Y^S participation in 24 detachments and Y^L participation in 3 detachments in the former case and Y^S participation in 24 exchanges and Y^L participation in one exchange in the latter case. It might be argued that the probability of recombination is a measure of genetic length, which is compounded of the probability of synapsis and the probability of exchange. The probability of synapsis based on nonhomologous, heterochromatin specific pairing has been discussed here and in the earlier paper (LINDSLEY 1955b), and it is possible, but not too likely, that the nonequivalence of cytological length and the probability of recombination is solely a reflection of the probability of synapsis, the probability of exchange being strictly proportional to prophase length. Whatever the true relation between these probabilities, it seems certain that one is not justified in estimating the probability of recombination from prophase length.

An indication of nonequivalence of cytological length and the probability of pairing is to be found in the disjunctive behaviour of heterochromatically different elements. SANDLER and BRAVER (1954) observed that $sc^8 \cdot Y$ and FR.2 (a $sc^8 \cdot Y$ from which nearly all of Y^S has been lost) show identical rates of meiotic loss in X/X/Y females. Furthermore, they have shown (see also GERSHENSON 1933) that an X chromosome deficient for half of the proximal heterochromatin as seen in metaphase, $In(1)sc^{4L}, sc^{8R}$, exhibits an extremely high rate of nondisjunction from the Y during spermatogenesis and that in such a situation the Y chromosome is lost with a high frequency. It has since been possible to demonstrate that this behavior is not correlated with the reduced cytological length of $In(1)sc^{4L}, sc^{8R}$, since a cytologically deficient chromosome, $In(1)sc^{LsL}, sc^{8R}$, gave normal meiotic behavior in the male and a chromosome of reported normal metaphase length, $In(1)sc^{4L}, sc^{LsR}$, exhibited the high nondisjunction and chromosome loss characteristic of $In(1)sc^{4L}, sc^{8R}$. (See below for discussion of break points of these inversions.)

Induced rearrangement offers another estimate of genetic length; the argument for nonequivalence of cytological length and breakage length is embodied in the block hypothesis of the structure of the proximal heterochromatin (MULLER and GERSHENSON 1935, MULLER et al. 1937, and GERSHENSON 1940), which states simply that the proximal heterochromatin is composed of blocks that are nonbreakable and that contribute nearly all of the heterochromatic metaphase length, and of other regions of high breakability that contribute little to the metaphase length. It is found for instance that the right breakpoints of $In(1)sc^8$ and $In(1)sc^4$ are in the proximal heterochromatin and that they are separated by

about one-fourth the total metaphase length of the X chromosome, so that $\text{In}(1)\text{sc}^{4L}, \text{sc}^{8R}$, which is deficient for the region between the breakpoints, is about 60% as long as $\text{In}(1)\text{sc}^{8L}, \text{sc}^{4R}$, which is duplicated for the region (GERSHENSON 1940). MULLER (1945) supports the contention that this region is unbreakable with his observation that the frequency of induced X-autosomal translocations is essentially similar in sperm bearing each of the above chromosomes. KAUFMANN's observation (1946) that the distribution between the proximal heterochromatin and the euchromatin of breaks in induced rearrangements scored in the salivary gland chromosomes of the F_1 of irradiated males is proportional to metaphase length has forced Muller to postulate that the heterochromatic region outside the $\text{sc}^{4R}\text{-sc}^{8R}$ interval is at least thirty times as breakable per unit length as the euchromatin. Actually, however, the data on which the block hypothesis rests concern not the nonrandom distribution of induced breaks within the proximal heterochromatin, but a nonrandom distribution of breaks within recovered rearrangements. The probability

of rearrangement is compounded of the probability of breakage and the probabilities of the various types of rejoining. The block hypothesis assumes a uniform distribution of rejoinability and concludes nonrandom breakability, whereas uniform breakability and nonrandom rejoinability would be equally consistent with the observations.

Whatever the explanation of the data that have led to the block hypothesis, it is apparent that caution must be exercised in correlating the probability of heterochromatic breakage, e.g., within a bridge, with cytological length.

The distribution of blocks within the proximal heterochromatin has been inferred from the metaphase lengths of various heterochromatic duplications and deficiencies. The agreement between the structure of the proximal heterochromatin as inferred from oögonial and neuroblast metaphase lengths and as inferred from neuroblast prophase lengths, however, are not in particularly good agreement, although they are not necessarily mutually exclusive. Fig. 6 is a comparison of the prophase structure as compiled from the experience of the author and personal communication with K. W. COOPER and B. P. KAUFMANN, to whom the author is indebted for permission to use their unpublished findings, and the metaphase structure as compiled from the work of MULLER et al. (1937) and GER-

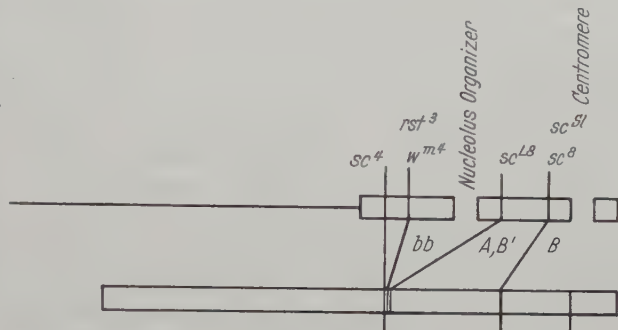


Fig. 6. Comparison of the prophase and metaphase localization of breakpoints of various inversions and known loci in the proximal heterochromatin. The relation between the size of the prophase figure (above) and the size of the metaphase figure (below) is arbitrary. B' is a block described by MULLER et al. (1937) distal to the $\text{In}(1)\text{sc}^8$ breakpoint, said probably to be the same as block B of GERSHENSON; block B of GERSHENSON (1940), however, is proximal to the $\text{In}(1)\text{sc}^8$ breakpoint. The three breakpoints indicated on the metaphase figure correspond to the regions of localized breakage described for 33 X chromosome deficiencies by GERSHENSON (1940)

SHENSON (1940). It can be seen that a considerable proportion of the prophase heterochromatin contributes nothing measurable to the length of metaphase heterochromatin, and yet this prophase length, unless there were drastic contraction between prophase and metaphase, should contribute measurable length to the metaphase chromosome.

That dyscentric exchange does occur has been demonstrated by the formation of rings from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{L}}, \text{EN}^{\text{R}}$. This fact coupled with the strong probability that heterochromatic exchange may be nonhomologous (above and LINDSEY 1955a) leads to the expectation that dicentric chromatids would be produced by heterochromatic exchange. A search for the products of rupture of bridges formed from such dicentrics among the recovered recombinants has yielded only two equivocal cases. Is the failure to recover unequivocal products of bridge rupture because of the inviability of such ruptured chromatids, e.g., owing to the institution of a bridge-breakage-fusion cycle; or is it because no dicentric chromatids were produced? The observation of SIDOROV (1940) that many of the losses of y^+ from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{S}}$ in heterozygous females are accompanied by simultaneous reinversion provides rather convincing evidence that bridge rupture need not lead to cell death. Figs. 2 and 3 show two ways in which a dicentric chromatid might arise from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$. One method is diagonal dyscentric exchange between the distal heterochromatin and the proximal heterochromatin of the long arm. There is no independent measure of the frequency of this type of exchange, but there are two measures of diagonal exchange involving the proximal heterochromatin of $\text{In}(1)\text{EN}$; one is eucentric diagonal exchange with the distal heterochromatin which should give rise to a tandem acrocentric compound X, of which none were observed, and the other is eucentric diagonal exchange with $\text{In}(1)\text{EN}^{\text{S}}$ to yield a reverse metacentric compound X (attached X); 6 attached X's were recovered from over 38000 X-bearing sperm of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ males. A second source of dicentric chromatids is diagonal dyscentric exchange between distal heterochromatin and $\text{In}(1)\text{EN}^{\text{S}}$. An independent measure of this event is the formation of rings from reciprocal dyscentric exchange between the distal heterochromatin and $\text{In}(1)\text{EN}^{\text{S}}$, of which only one case has been observed. The importance of other sources of dicentric chromatids, such as sister union in the distal heterochromatin and dyscentric exchange with autosomal or Y chromosome heterochromatin is not possible to estimate, but the formation of an X-autosome dicentric would cause the concomitant loss of the synaptic autosomal arm, which would lead to cell death except when chromosome 4 is involved. Consequently, the grounds for expecting an appreciable frequency of dicentric chromatids are not particularly substantial, and the failure to recover unequivocal products of bridge breakage is not necessarily contradictory to the aforementioned observations of SIDOROV.

Summary

The distal uninverted portion of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{S}}$, which carries y^+ and ac^+ , is occasionally lost during spermatogonial divisions. This is accomplished by exchange between the portion of the proximal heterochromatin that has been removed distally by the inversion and some other heterochromatin in the complement

(see also LINDSLEY 1955b). The majority of the recombinants recovered from males carrying $\text{In}(1)\text{sc}^8$ arise through exchange with the Y chromosome (12/15). The majority of the recombinants recovered from males carrying $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$, which is characterized by a heterochromatic second arm, do not arise through exchange with the Y chromosome (18/22). The absolute frequencies of Y involvement with $\text{In}(1)\text{sc}^8$ (7/105067) and $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ (2/38588), however, are comparable. The heterochromatic constitution of the recombinants examined is consistent with the hypothesis that an observed excess of recombinants recovered from $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}, \text{EN}^{\text{R}}$ as compared with $\text{In}(1)\text{sc}^8$ is accounted for by Y independent recombinants and is the consequence of exchange between the second heterochromatic arm of $\text{In}(1)\text{EN}^{\text{R}}$ and the distal heterochromatin of $\text{In}(1)\text{sc}^{\text{SL}}$. A maximum of six different regions of exchange between these two regions may be inferred from the constitution of the recombinants. This inference is considered to support the hypothesis that pairing and exchange between heterochromatic regions are not strictly homologous.

Acknowledgments. The author wishes to express his appreciation to his many colleagues for invaluable suggestions throughout the course of this prolonged investigation. To be especially mentioned are Dr. A. H. STURTEVANT, Dr. K. W. COOPER, and Dr. E. NOVITSKI for stimulating discussion and Mrs. E. S. VON HALLE for technical assistance in the final phases of the work. Thanks are also due the Atomic Energy Commission, the National Research Council, and the National Science Foundation for fellowship support during most of these investigations.

References

- COOPER, K. W.: Studies on spermatogenesis in *Drosophila*. Amer. Phil. Yr. Bk. **1951**, 146—147. — GERSHENSON, S.: Studies on the genetically inert region of the X chromosome of *Drosophila*. I. Behavior of an X chromosome deficient for part of its inert region. J. Genet. **28**, 297—313 (1934). — The nature of the so-called genetically inert parts of chromosomes. Vid. Akad. Nauk URSS **1940**, 3—116. — KAUFFMANN, B. P.: Organization of the chromosome. I. Break distribution and recombination in *Drosophila melanogaster*. J. of Exper. Zool. **102**, 293—320 (1946). — LINDSLEY, D. L.: The occurrence of inverted attached X chromosomes. *Drosophila* Information Service **24**, 84 (1950). — On the position of the right break point of $\text{In}(1)\text{w}^{\text{m4}}$ and $\text{In}(1)\text{rst}^3$. *Drosophila* Information Service **28**, 130 (1954). — Heterochromatic exchange between a reversed acrocentric compound X chromosome and the Y chromosome. *Drosophila* Information Service **29**, 134 (1955a). — Spermatogonial exchange between the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **47**, 24—44 (1955b). — LINDSLEY, D. L., and L. SANDLER: The effect of a free heterochromatic X chromosome duplication on the disjunction of normal fours. *Drosophila* Information Service **30**, 131—132 (1956). — MCCLINTOCK, B.: The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. Genetics **26**, 234—282 (1941). — The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **28**, 458—463 (1942). — MORGAN, L. V.: Origin of attached X chromosomes in *Drosophila melanogaster* and the occurrence of non-disjunction of X's in the male. Amer. Naturalist **72**, 434—446 (1938). — MULLER, H. J.: The non-equivalence of the blocks and the salivary "heterochromatin". Genetics **30**, 15 (1945). — MULLER, H. J., and S. M. GERSHENSON: Inert regions of chromosomes as the temporary products of individual genes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **21**, 69—75 (1935). — MULLER, H. J., D. RAFFEL, S. M. GERSHENSON and A. A. PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA: A further analysis of loci in the so-called "Inert region" of the X chromosome of *Drosophila*. Genetics **22**, 87—93 (1937). — NOVITSKI, E.: An inversion of the entire X chromosome. *Drosophila* Information Service **23**, 94—95 (1949). — The compound X chromosomes in *Drosophila*. Genetics **39**, 127—140 (1954). — SANDLER, L.: A genetic analysis of reversed acrocentric compound X chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Genetics **39**, 923—942 (1954a). — Heterochromatic exchange between reversed acrocentric compound X chromosomes and FR2.

Drosophila Information Service **28**, 153—154 (1954b). — SANDLER, L., and G. BRAVER: The meiotic loss of unpaired chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **39**, 365—377 (1954). — SANDLER, L., and E. NOVITSKI: Evidence for genetic homology between chromosomes I and IV in *Drosophila melanogaster*, with a proposed explanation for the crowding effect in triploids. *Genetics* **41**, 189—193 (1956). — SCHULTZ, J., and D. G. CATCHESIDE: The nature of closed X chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* **35**, 315—320 (1937). — SCHWARTZ, D.: Studies on the mechanism of crossing over. *Genetics* **39**, 692—700 (1954). — SIDOROV, B. N.: The cause of mosaicism in aberrations connected with breaks in the inert chromosome regions in *D. melanogaster*. *Bull. Biol. Méd. Exper. URSS.* **9**, 10—12 (1940). — Spontaneous mutations in the scute inversion of *Drosophila melanogaster*. *C. r. (Doklady) Acad. Sci. URSS.* **30**, 248—249 (1941). — STERN, C.: Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **21**, 625—730 (1936).

Dr. DAN L. LINDSLEY, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory,
Post Office Box Y, Oak Ridge, Tennessee

Department of Zoology, University of Melbourne

THE MUTAGENIC ACTION OF PYRONIN IN DROSOPHILA

By

A. M. CLARK *

(Eingegangen am 4. November 1957)

The testing of a number of basic dyes for mutagenic properties led to the finding that xanthene dyes in general seem to give positive results with *Drosophila*, the most effective member of the series being pyronin-B (CLARK 1953). This dye had already been shown by WITKIN (1947) to be mutagenic in bacteria. It is widely used as a cytochemical reagent and gives valuable information on the intracellular distribution of pentose nucleic acid. Since the dye can be shown to combine in the living cell with structures containing nucleic acid, the suggestion has been put forward (CLARK) that its mutagenic effects are the result of direct combination with the nucleic acid of the chromosomes, causing an error in duplication or an interference with the spatial arrangement of nucleotides characteristic for a given locus.

HOFFMAN (1953) has reported that pyronin is able to bring about a remarkable acceleration in the rate of re-innervation of partially denervated muscle in rats. It is tempting to speculate that its effect on regeneration has its basis in an influence of the dye on the synthesis of nucleic acids in the perikaryon of the neurone and, therefore, ultimately on the synthesis and flow of axoplasm along the axon (EDDS 1953).

Further biological activity of the dye has been demonstrated by KUPKA (1955) who finds that in very dilute solutions, pyronin is able to produce a variety of chromosomal structural abnormalities and mitotic disturbances in the epidermal cells of larval *Triton*. KUPKA also attributes these effects to interference with the metabolism of nucleic acids, although direct evidence is again lacking.

AUERBACH (1955) has confirmed that pyronin is mutagenic when added to the food on which *Drosophila* is reared. She noted marked heterogeneity in the response obtained, suggesting that rather special cellular conditions are necessary for the maximum genetic effect is to be produced.

The present paper reports further attempts to analyse the action of this mutagen in *Drosophila*.

Material and Methods

In all of the experiments described in the present paper, a Canton-S wild type strain was used for treatment. A spontaneous mutation rate of about 0.1% is observed for sex-linked recessive lethals in the first batch of sperm produced by males reared at 25° C.

The pyronin culture medium was prepared by using a 0.1% aqueous solution of the dye (8×10^{-3} M) in place of water when cooking the usual standard cornmeal and molasses medium. A single sample of the dye (Merck) has been used for all experiments. It was freed from impurities by refluxing in absolute alcohol for two hours, followed by evaporation to dryness.

* *Acknowledgments.* My thanks are due to Mrs. E. G. CLARK, Miss M. M. GUNSON and Mr. J. THOMSON for technical assistance and to Dr. CHARLOTTE AUERBACH for her helpful criticism of the manuscript.

Sex-linked recessive lethals were detected by the *Basc* method (MULLER-5), while the sifter technique was used to detect lethals on the second chromosome. When collecting successive broods of offspring, three females were provided for each male during the specified mating interval. All transfers of flies to fresh tubes and mates were made without the use of any narcotic, for observations made in this laboratory have indicated that the use of ether or carbon dioxide to immobilise males may sometimes inhibit subsequent mating behaviour for as long as 36 hours.

Cultures were maintained at 25° C. In the experiments in which temperature shocks were applied in an attempt to enhance the mutagenic effect of the dye, the treatment consisted of exposure for one hour to temperatures of either 1° C or 35° C.

Results

1. Heterogeneity of response

AUERBACH (1955) has already demonstrated that pyronin culture medium produces similar mutation rates in successive broods of offspring obtained from treated males. Together with the production of clusters of identical mutations this fact led her to suggest that the mutagenic action of the dye extends back as far as the spermatogonial stage. Our own observations are in agreement with this. The scoring of second chromosome lethals by the sifter technique enabled tests of allelism to be carried out, and these established that a large proportion of the lethals were in fact of common origin. On the other hand, no instances of allelism have been observed when testing mutants produced in different males, so there is no evidence for any locus specificity of action in the spermatogonia.

The most striking feature of the mutagenic action of pyronin is the extreme heterogeneity in response. In some males the effect is very great indeed, while in others from the same culture, it is quite negative. Presumably, as AUERBACH has pointed out, special physiological conditions must be fulfilled if the dye is to produce mutations. Since pyronin is a fluorescent dye, it seemed possible that an increased mutagenic effect might be obtained by means of a photodynamic action. It may be recalled that DÖRING (1938) obtained an apparent increase in mutation rate in *Neurospora* by exposure to bright light following sensitisation with the fluorescent dye, eosin. Although DÖRING's results are in themselves not very convincing, nevertheless it seemed worthwhile to attempt to detect photodynamic action with pyronin.

Two procedures were adopted. In the first experiments, flies reared on pyronin medium were kept either in total darkness or exposed to bright light for the entire period from egg laying to the emergence of the adults. The light source was a 250 watt lamp, the cultures being inclined at 45 degrees to the lamp and at a distance of 30 cms. In both dark and light series, a water bath was used to maintain a constant temperature of 25° C. No significant difference was observed in the mutagenicity of the dye under the two sets of conditions (Table 1). Clustering was marked in both cases.

In the second series of experiments, HADORN and NIGGLI's (1946) transplantation technique was used. Ovaries of third instar Canton-S larvae were treated *in vitro* for 20 minutes in 2×10^{-5} M pyronin in saline and under conditions of total darkness or bright illumination respectively. Following implantation into female host larvae from the *Basc* stock, sex-linked lethals were scored

the usual way. In these experiments, regardless of the conditions of illumination, no mutagenic effect of the dye could be demonstrated, although in the light and dark series combined a total of more than 800 chromosomes was tested from 33 successful transplantations. Not only does this negative result fail to

Table 1. *Sex-linked recessive lethals induced by 0.1% pyronin food in light and darkness. Twenty males tested in each series*

	Brood			
	1—5 days		6—10 days	
	Highest rate per male	Overall rate	Highest rate per male	Overall rate
Light . . .	2/17	3/355 (0.85%)	1/12	2/199 (1.0%)
Dark . . .	3/20	3/389 (1.03%)	2/19	3/401 (0.75%)

indicate any evidence for photodynamic action, but it would suggest that pyronin may not be mutagenic when tested by HADORN'S method. AUERBACH'S data (1955), while not conclusive, suggested that pyronin, when added to the food of *Drosophila*, has a mutagenic effect on oogonia. This observation has been confirmed and extended on a larger scale in this laboratory. From Canton-S females reared on pyronin medium, about 0.7% sex-linked recessive lethals may be obtained, heterogeneity being again a feature of the response. It is therefore unlikely that the failure to get a positive result with HADORN'S method is due to lack of penetration of the dye into the oogonial cells. Perhaps a positive result might be obtained if a wider range of dye concentrations were tested. It is hoped to undertake this in future experiments.

In other experiments in which males were tested by the *Base* method in the usual way, attempts were made to enhance the mutagenic effectiveness of the dye by minimising or by increasing larval competition for food, by delivering high or low temperature shocks to larval and pupal stages and by varying the dye concentration in the food medium over a range from 0.05% to 1.0%, but again no change in mutagenicity could be demonstrated, nor did the heterogeneity in response appear to diminish. The conditions that favour the action of the dye are still quite unknown.

An attempt to rear in population cages a strain resistant to the mutagenic effect of pyronin also gave a negative result. After 27 generations on 0.6% pyronin medium, the experimental line when tested gave essentially the same induced mutation rate as the control line, which had been reared under similar conditions except that the dye was omitted from the culture medium.

2. Response in adult flies

In the previous experiments, pyronin was included in the food medium on which the larvae were developing. In a further series, Canton-S males were reared on normal culture medium. Then, within 36 hours of eclosion, they were transferred to unyeasted 0.1% pyronin medium and allowed to remain there for four days. At the end of that period, they were mated to *Base* females to obtain four successive broods. This treatment was mutagenic, the sensitive stage

appearing to be the spermatogonial cells, for the highest mutation rate appeared to be within the later broods (Table 2).

On the other hand, the injection of 0.6 microlitres of a 10^{-3} M (0.036% solution of pyronin in saline into males reared on normal culture medium elicited a scarcely detectable response, (Table 3). It would seem, therefore, that injection of pyronin is far less effective than its inclusion in the food medium. The reason

Table 2. *Sex-linked recessive lethals induced by feeding pyronin to adult males. Twenty seven males tested*

Brood	Highest rate per male	Overall rate
1-3 days	—	0/414
4-7 days	2/23	2/632 (0.32%)
8-11 days	3/11	3/310 (0.97%)
12-15 days	2/14	4/376 (1.06%)

Table 3. *Sex-linked recessive lethals induced by injection of 10^{-3} M (0.036%) pyronin solution into thirty adult males*

Brood	Highest rate per male	Overall rate
1-5 days	1/24	1/620 (0.16%)
6-12 days	2/19	2/454 (0.44%)

for this is not clear. It may be that for maximum effect it is necessary for the dye to be present at a certain minimal concentration for a prolonged period, and this would be achieved best by the feeding method, or it may be that during the process of food digestion and absorption, the dye undergoes some change which enhances its mutagenicity.

SOBELS (1955) has shown that pretreatment with cyanide or azide enhances the mutagenic effectiveness of X-irradiation. More recently, he has shown (SOBELS 1956) that pretreatment with cyanide renders female *Drosophila* sensitive to the mutagenic action of formaldehyde, a chemical

mutagen towards which they had previously been considered to be resistant (HERSKOWITZ 1950; AUERBACH 1951; AUERBACH and MOSER 1953). If the action of azide or cyanide is to lower the threshold for response to mutagenic agents in general, perhaps by allowing a sensitising metabolite to accumulate, one might expect that simultaneous treatment with either of these agents would increase the mutagenic effectiveness of pyronin. However, this expectation is not realised for the injection of either azide or cyanide into adult males fails to alter the response given to injections of pyronin.

It has already been noted (CLARK 1953) that methyl pyronin (pyronin-Y) is less effective than pyronin-B, the tetra-ethyl form. Nevertheless it shows the same pattern of sensitivity and heterogeneity of response as pyronin B. On the other hand, attempts to demonstrate a mutagenic action of methyl pyronin when injected or fed to adults gave negative results.

3. Chromosome breakage

Early in the analysis of the action of pyronin, some preliminary attempts had been made to utilise dominant lethals as an index of the mutagenic action of the dye, but no conclusive results were obtained. Subsequently, an experiment was carried out to ascertain whether pyronin is capable of producing recoverable translocations. To this end, males reared from the egg stage on pyronin medium were mated to *Basc*; *brown*; *scarlet* females and the F₁ males were back-crossed to *brown*; *scarlet* females for the detection of translocations involving the two

large autosomes. The F 1 females were utilised in the usual way for the detection of sex-linked lethals. In a total of 1,307 cultures, none of the F 1 males proved to be heterozygous for a 2:3 translocation, although the recovery of several sex-linked lethals from the F 1 females showed clearly that the pyronin treatment had been effective.

In view of this negative result, a second experiment was carried out using a more efficient procedure for the detection of translocations. Apart from serving to detect only those rearrangements involving the second and third chromosomes, the use of the *Basc*; *brown*; *scarlet* stock has the disadvantage that many of the *Basc* males in the F 1 are found to be sterile. Therefore, in the second experiment the treated males were mated to *Y*; *bu*; *e¹ro*; *ey²* females. From this mating, the F 1 males are vigorous and show high fertility. Moreover, the attached-X chromosomes and the additional markers served to detect translocations involving the X and fourth chromosomes as well as the second and third. From a total of 3,411 cultures spread over five broods, no translocations were recovered.

A dose of X-rays giving only about 1% sex-linked recessive lethals would not be expected to produce many translocation in spermatogonial cells, and therefore the failure to obtain them after pyronin feeding may not seem surprising. However, it should be noted that the heterogeneity in response to pyronin sometimes results in an extraordinarily high incidence of lethals from certain males, a high incidence not to be explained solely in terms of the repeated recovery of one original mutant induced in a spermatogonial cell. One might reasonably expect that sometimes a similarly "responsive" or "sensitive" male should be noted when attempting to detect translocations.

A further attempt was made to obtain evidence for the ability of pyronin to produce breakage by utilising ring-X chromosomes. As other investigators have shown, notably BAUER (1939), LEA and CATCHESIDE (1945) and FABERGÉ and MOHLER (1951), if males carrying a ring-X chromosome are irradiated with X-rays or ultraviolet light and then mated to normal females, there is a relative surplus of male offspring with a consequent distortion of the sex-ratio. This is occasioned by the failure to recover a certain proportion of broken ring-chromosomes in which double-size dicentric or interlocking rings have been formed. These aberrations behave as dominant lethals to the female offspring which receive them.

The experimental figures are presented in Table 4, giving the sex-ratio of the offspring obtained during the first four days from Canton-S females mated to X^{c2} males which had been reared on pyronin medium. The control figures were obtained by using X^{c2} males reared on normal medium. The slight decrease in the percentage of females in the pyronin series is not statistically significant.

Both BATTAGLIA (1950) and RENDEL (personal communication) have found that pyronin can cause chromosome breakage in root tip cells of *Allium*, but these investigators used concentrated solutions of the dye. KUPKA (1955), on the

Table 4. *The sex-ratio of offspring from X^{c2} males mated to Canton-S females*

	Females	Males	Females %
Control .	3,611	3,669	49.60%
Pyronin.	3,130	3,353	48.28%
$chi^2 = 2.52 \quad P = 0.11$			

other hand, has observed chromosome breakage in *Triton* epidermal cells after treating them with very dilute solutions, from $1/10^{-4}$ down to as low as $1/10^{-7}$. This is certainly within the range of the effective concentration of the dye in *Drosophila*. Since only gonial cells appear to be sensitive to the action of pyronin, the failure to recover translocations may be the consequence of germinal selection. However, such selection would in the case of the experiments with ring-X chromosomes only serve to increase a distortion in the sex-ratio consequent upon breakage. Although the slight decrease in the percentage of females is in the right direction, the question is still open.

In view of MAZIA'S (1954) demonstration of the importance of calcium ionic bonding in the maintenance of the structural integrity of chromosomes, followed by LEVINE'S (1955) observation that treatment with calcium salts or chelating

Table 5. *Sex-linked recessive lethals and 2:3 translocation induced in males reared on pyronin, pyronin + versene or versene culture medium*

Medium	Lethals		2:3 Translocations	
	1—5 days	6—10 days	1—5 days	6—10 days
pyronin . .	1/214 (0.47%)	2/190 (1.05%)	—	—
pyronin + versene . .	3/291 (1.03%)	3/468 (0.64%)	0/244	0/303
versene . .	0/612	1/808 (0.12%)	0/549	0/777

agents can produce significant changes in the amount of crossing-over that occurs in *Drosophila*, an attempt was made to supplement the action of pyronin by the inclusion of 0.02 M versene in the pyronin culture medium, but without success. Versene itself is not mutagenic in *Drosophila* (Table 5).

Discussion

In common with many other mutagens, pyronin is able to produce delayed mutations and a further crop of lethals may be obtained by culturing through F₂ cultures for another generation. Although delayed manifestation of mutation may be the consequence of partial breakage of a multiple strand, followed by sorting out of a mixture of damaged and undamaged threads, AUERBACH (1951) has advanced reasons for believing that in some cases at least, the delay is the result of the mutagen having succeeded in but lifting the gene to a labile state which requires additional energy, perhaps from thermal agitation, for the completion of the mutation process.

The question was raised elsewhere (CLARK 1953) as to whether the action of pyronin is not in fact initiated in the first place by combination of the dye with nucleic acid present in the cytoplasm, followed by the incorporation of a modified nucleic acid into the structure of the chromosomes during a subsequent division. However, mating wild type males to *Basc* females which had been reared on pyronin medium gave no lethals in 792 X chromosomes derived from the male parents. Five lethals were detected on the *Basc* chromosome. In a personal communication, AUERBACH has drawn attention to the high spontaneous mutation rate that may be observed in strains carrying markers similar to those on the *Basc* chromosome. It is therefore doubtful whether in this experiment the dye had

exerted any mutagenic effect at all. There is certainly no indication of mutagenic action initiated in the egg cytoplasm and culminating in change in the introduced wild type X chromosome.

That pyronin would prove to have an influence on some physiological activities became apparent with HOFFMAN's (1953) demonstration of the effect of the dye on nerve sprouting in rats. Pyronin is also able to bring about an acceleration in the growth rate of *Drosophila*. When larvae are reared on Kleenex tissue soaked in a suspension of live yeast in dye solution, the adults emerge 24 hours before those of the control series kept on yeast suspensions in distilled water. At 25°C, the optimum dye concentration is about 10^{-3} M (0.036%). Concentrations greater than 10^{-2} M, on the other hand, are toxic and have a retarding effect. It is possible that these effects on the growth rate of *Drosophila* are indirect via the living yeast cells. On the other hand, if they are direct effects then, as AUERBACH suggests (personal communication), a balance between acceleration and retardation of development might give some indication of the cause of heterogeneity in the genetic response of the larvae. If a similar balance is involved in those processes which lead to mutation, then slight differences in the amount of dye ingested may serve to swing the balance one way or the other.

Pyronin is able to bring about a non-specific inhibition of certain enzymes in vitro, e.g. carbonic anhydrase, catalase, cytochrome oxidase. However, in all these cases dye concentrations in excess of 0.05 M (1.8%) are necessary to bring about inhibition in excess of 50% (CLARK unpublished). In the presence of 0.5% glucose, 3×10^{-4} M pyronin (0.01%) is sufficient to inhibit the rate of oxygen uptake of yeast cells by more than 50%, but the anaerobic metabolism of glucose by yeast is unaffected except at dye concentrations exceeding 10^{-3} M. When present in excess of 5×10^{-4} M (0.021%), pyronin is able to retard the synthesis of „galactozymase“ when rapidly adapting strains of *Saccharomyces cerevisiae* are brought into contact with galactose, but no stimulation of adaptive enzyme formation could be demonstrated with more dilute solutions of the dye. Such stimulation might have been expected in the light of HOFFMAN's suggestion that pyronin can increase the rate of protein synthesis.

Clearly, pyronin is capable of producing a complex pattern of biological effects, and this would seem to support the possibility that the mutagenic activity of the dye is the ultimate result of inhibition or possibly stimulation, of some metabolic channel, resulting in the formation of an end-product capable of inducing damage in the chromosomes. On the other hand, the inhibition of enzymes would seem to require rather high concentrations of the dye and in excess of those which might reasonably be expected to occur within the cells of flies reared on a pyronin culture medium. However, it is not safe to speculate on the concentration levels reached by the dye within living cells, for adsorption at interfaces might give rise to very high local accumulations of pyronin molecules, quite apart from possible active accumulation. Fluorescence microscopy can demonstrate that the dye penetrates the living nuclear membrane. Beyond that, we cannot go in our present state of knowledge.

Summary

1. When tested by injection or by the feeding method, pyronin is mutagenic in *Drosophila*, but there is extreme heterogeneity in the response.

2. The mutagenic effectiveness of the dye seems to be restricted to gonial cells.
3. Attempts to enhance the effectiveness of the dye by supplementary chemical and physical treatments all failed.
4. Pyronin can inhibit a number of enzymes. However, the mode of action in producing genetic effects is still obscure.

Literature cited

- AUERBACH, C.: Problems in chemical mutagenesis. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 199 (1951). — The mutagenic action of pyronin B. Amer. Naturalist **89**, 241 (1955). — AUERBACH, C., and H. MOSER: An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. I. Sensitivity of *Drosophila* germ cells. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 479 (1953). — BATTAGLIA, E.: Nuove sostanze inducenti frammentazione cromosomica. Pubbl. Staz. zool. Napoli **22** (Suppl.) 125 (1950). — BAUER, H.: Die Dosisabhängigkeit röntgen-induzierter Chromosomenmutationen im Ring-X Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Naturwissenschaften **27**, 821 (1939). — CLARK, A. M.: The mutagenic activity of dyes in *Drosophila melanogaster*. Amer. Naturalist **87**, 295 (1953). — DÖRING, H.: Photosensibilisierung der Gene? Naturwissenschaften **26**, 819 (1938). — EDDIS, MAC V.: Collateral nerve regeneration. Quart. Rev. Biol. **28**, 260 (1953). — FABERGÉ, A. C., and J. D. MOHLER: Breakage of chromosomes produced by ultra-violet radiation in *Drosophila*. Nature (Lond.) **169**, 278 (1951). — HADORN, E., and H. NIGGLI: Mutations in *Drosophila* after chemical treatment of gonads in vitro. Nature (Lond.) **157**, 162 (1946). — HERSKOWITZ, I. H.: The differential induction of lethal mutations by formalin in the two sexes of *Drosophila*. Science **112**, 302 (1950). — HOFFMAN, H.: Acceleration and retardation of the process of axon sprouting in partially denervated muscle. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **30**, 541 (1953). — KUPKA, E.: Über die Wirkung von Pyroninlösung auf die Epidermiszellen der Larven von *Triton alpestris*. Öst. zool. Z. **5**, 442 (1955). — LEA, D., and D. G. CATCHESIDE: Dominant lethals and chromosome breaks in ring-X chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **47**, 25 (1945). — LEVINE, R. P.: Chromosome structure and the mechanism of crossing-over. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **41**, 727 (1955). — MAZLA, D.: The particulate organisation of the chromosome. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 521 (1954). — SOBELS, F. H.: The effect of pretreatment with cyanide and azide on the rate of X-ray induced mutations in *Drosophila*. Z. indukt. Abstamm.- und Vererb.-Lehre **85**, 399 (1955). — Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. II. The production of mutations in females and the induction of crossing-over. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 743 (1956). — WITKIN, E.: Mutations in *Escherichia coli* induced by chemical agents. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 256 (1957).

Dr. A. M. CLARK, Department of Zoology, University of Melbourne,
Melbourne N. 3, Australia

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

MUTATIONS AUSLÖSUNG DURCH CHEMIKALIEN BEI *ANTIRRHINUM MAJUS* L.*

Von

RAINER BERGFELD

(Eingegangen am 23. November 1957)

A. Einleitung

Die ersten Ergebnisse der am hiesigen Institut unternommenen Versuche (vgl. OEHLKERS 1956) ließen viele Fragen offen und eröffneten wieder zahlreiche neue Probleme. Diese zu lösen erforderte ein weiteres Arbeiten in dieser Richtung. Daß dadurch nicht alle Fragen beantwortet werden konnten, liegt vor allem mit an der Langwierigkeit dieser Versuche, die eine oftmals erwünschte Nachkontrolle der Ergebnisse erst wieder nach Jahren ermöglicht. Es sollen hier deshalb nur die einstweiligen Ergebnisse mitgeteilt werden und diese vor allem in Zusammenhang gebracht werden mit anderen hier im Institut unternommenen Mutationsversuchen. In diesen wurden in zahlreichen Untersuchungen die verschiedensten Chemikalien auf ihre Einwirkung in Mitosis (vgl. OEHLKERS 1953 und da zit. Lit.) und Meiosis (vgl. OEHLKERS 1943, 1951, LINNERT 1953 u. a. m.) untersucht. Unter anderem zeigte es sich dabei, daß eine gewisse Spezifität in der Wirkung einzelner Substanzen bei chromosomalen Mutationen besteht; daß beispielsweise die Schwermetallsalze bestimmte Chromosomen und Chromosomenorte bevorzugt angreifen (GLÄSS 1956, WOLL 1952). Bis jetzt ließ sich allerdings eine ähnliche Erscheinung bei *Antirrhinum* nicht feststellen. — Die Arbeiten beschränken sich deshalb im allgemeinen vorerst darauf, die mutagene Wirkung von Chemikalien an phänotypisch erkennbaren Mutanten zu eruieren und sie in Vergleich zu bringen mit den an *Oenothera*-bastarden und anderen Objekten erhaltenen Chromosomenmutationen. Auf diese Weise ist es möglich, Aufschlüsse über die Identität zwischen phänotypisch sichtbaren Mutationen und Chromosomenmutationen, was verschiedentlich angezweifelt wurde, aber bei *Drosophila* und *Zea Mays* (vgl. STADLER 1933, STUBBE 1940) schon erwiesen wurde, zu erhalten.

B. Material und Methode

Über die zu den Versuchen verwendeten Pflanzen und die Applikationsweise wurde schon in der ersten Veröffentlichung dieser Versuchsserie ausführlich berichtet (vgl. OEHLKERS 1956). Zum Methodischen ist noch auszuführen, daß die abgespaltenen Sproßteile nie länger als 3 Std in den Lösungen verblieben, bei Stickstofflost sogar nur 1 Std. Danach wurden die Sproßteile wieder mit Bast verbunden und die Wunden mit Watte feucht gehalten, bis sie miteinander verwachsen waren. Die Applikationszeit mußte so kurz gehalten werden, weil, wie auch STANGE (1951) an *Oenothera* gefunden, und wie es die Stickstofflostversuche besonders deutlich zeigen, bei einer längeren Einwirkung der Substanz die Pflanzen sehr leicht an einer

* Herrn Prof. Dr. FR. OEHLKERS danke ich herzlichst für die stete Unterstützung und Förderung dieser Versuche und für das Interesse, welches er ihnen entgegenbrachte. Ebenso sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung der Mittel, die eine Durchführung dieser Versuche erst ermöglichte, gedankt.

toxischen Wirkung zugrunde gingen. Sie konnte aber auch so kurz gehalten werden, weil man durchaus zu der Annahme berechtigt ist, daß die einmal in den Transpirationsstrom gebrachte Substanz auch mit diesem bis in die Knospen gelangt. Nach der Behandlung wurden an den Infloreszenzen alle Knospen, in denen die Meiosis abgelaufen war, entfernt. Dieses Stadium richtig zu schätzen, ist bei *Antirrhinum* insofern schwierig, weil die Knospen, in denen die Meiosis eben verläuft, kaum in der Größe von post- und prämeiotischen zu unterscheiden sind. Hinzu kommt noch, daß bei *Antirrhinum*, wie ERNST (1938) feststellte, die Meiosis relativ schnell abläuft, in längstens 36 Std (vgl. hierzu *Oenothera* 4—5 Tage oder *Paeonia* etwa 6 Tage). Um den darin liegenden Fehlern zu begegnen, wurde später bei den Kreuzungen der Pollen von vier aufeinanderfolgenden Blüten genommen, von denen vermutlich eine der mittleren beiden während der Behandlung gerade die Meiosis durchlief. Die einzelnen Knospenbezeichnungen wurden bei den Kreuzungen beibehalten, so daß die Nachkommenschaften einer jeden Knospe verfolgt werden konnten.

In der 3. Versuchsserie wurden folgende Substanzen appliziert:

Aqua dest.
m/100 Aluminiumchlorid
m/100 Codein
m/100 Morphin
m/1000 Morphin
0,01% Thymonukleinsäure + m/100 Kaliumchlorid
m/1000 Stickstofflost

Die Thymonukleinsäure wurde in 5 ml n/10 Ko OH gelöst, mit n/10 HCl neutralisiert und auf die angegebene Konzentration verdünnt. Die mit Stickstofflost behandelten Pflanzen starben, trotz vorsichtiger Applikation, ab. — Alle Pflanzen erlitten während der Behandlung einen Turgeszenzverlust, die meisten richteten jedoch nach 2—3 Tagen ihre Infloreszenzen wieder auf. Bei den mit Codein und Aluminiumchlorid behandelten Pflanzen traten an den Brakteen Nekrosen auf. Eine der mit Codein behandelten Pflanzen starb ebenfalls ab. Die übrigen behandelten Pflanzen zeigten keine äußerliche Wirkung. Die Applikation wurde im Gewächshaus bei 23° C und hoher Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

C. Ergebnisse

1. Die mutagene Wirkung der applizierten Chemikalien

Nicht alle der in der 3. Versuchsserie verwendeten Chemikalien wirkten in dem Maße mutagen, daß das Mehr der spaltenden F_2 -Nachkommen als eine gesicherte Erhöhung der Mutationsrate aufgefaßt werden kann. Dies trifft vor allem für die beiden Morphinversuche zu. Mit einem P -Wert von $> 0,3$ bzw. 0,058 liegen sie erheblich über dem Wert, der noch eine einigermaßen gesicherte Erhöhung der Mutationsrate angibt. Für unsere Versuche wurden als eine sehr gute Differenz zwischen Befund und Erwartung die Werte $P = 0,01$ oder $P < 0,01$ angesehen und als gut bzw. eben noch gesichert die Werte bis $P = 0,05$. Die Versuche mit Morphin in der ersten Versuchsserie (vgl. OEHLKERS 1956) erbrachten, vor allem wegen der zu hohen Spontanmutationsrate der zu den Versuchen verwendeten Sippe, keine klaren Ergebnisse. Inzwischen wurde für die neuen Versuche eine Linie isoliert, deren spontane Mutationsrate innerhalb der Fehlerquelle des für die Sippe 50 gefundenen Wertes liegt.

Dagegen kann die Mutationserhöhung durch das dem Morphin sehr nahe verwandte Codein mit $P = 0,0027$ als sehr gut gesichert gelten. Ebenso der Versuch mit Aluminiumchlorid. Schon in der 2. Versuchsserie war eine Mutationserhöhung durch Aluminiumchlorid mit $P = 0,025$ sehr gut gesichert. Er wurde deshalb wiederholt, weil in diesem Versuch relativ viele Nachkommenschaften eine Spaltung in einer Mutante zeigten (vgl. Tabelle der Mutanten). Daß dem

aber keinerlei Bedeutung zukommt, zeigte die letzte Versuchsserie, in der diese Mutante in allen Versuchen mehr oder weniger häufig auftrat. Als noch gesichert können wir die Erhöhung des Mutationsprozentsatzes des Thymonukleinsäureversuches ansehen. Bemerkenswert ist die relativ hohe Mutationsrate des Ver-

Tabelle 1

	Auf- gezogene F_2 -NK	Gefundene Werte		Prozent der spaltenden NK	P-hom
		nicht- spaltende NK	spaltende NK		
m/100 Morphin . .	254	248	6	2,4	>0,3
m/1000 Morphin .	188	181	7	3,7	0,058
Codein	228	215	13	5,7	0,0027
Aluminiumchlorid .	158	148	10	6,2	0,004
Thymonukleinsäure	337	324	13	3,8	0,049
Aqua dest. . . .	416	400	16	3,8	0,06
Sippe 50	300	296	4	1,3	

suches mit Aqua dest. Diese anfangs etwas unerwartete Wirkung des destillierten Wassers zeichnete sich schon in der 2. Versuchsreihe ab. Dieser Versuch konnte aber wegen einer zu kleinen F_2 nicht sicher ausgewertet werden. Bei diesem Versuch spalteten von 49 F_2 -Nachkommenschaften vier in einem monohybrid mende-
lndes Merkmal. Diese Versuche zeigen, daß man nicht ohne weiteres bei derartigen Versuchen Aqua dest. als Kontrollsubstanz verwenden darf.

2. Die Abhängigkeit der Chemikalienversuche vom Entwicklungsstadium der Knospen

Versuche an *Lilium* (SAUERLAND 1956) zeigten, daß in bestimmten Meiosisstadien die Chromosomen gegenüber Chemikalien besonders anfällig sind. In unseren Versuchen ließ sich das natürlich nicht so genau feststellen, aber es war durchaus möglich, innerhalb der verschieden alten Knospen einer Infloreszenz Differenzen bezüglich der Häufigkeit der aus ihnen hervorgegangenen spaltenden F_2 -Nachkommenschaften festzustellen.

Für diese Auswertungen wurden auch die Ergebnisse der 2. Versuchsserie herangezogen, die in dieser Hinsicht ein klareres Bild ergeben. Es wurde schon eingangs erwähnt, daß die älteste Knospe einer Infloreszenz, deren Pollen zu Kreuzungen verwendet wurde, sehr wahrscheinlich die Meiosis durchlaufen hatte. Wenn wir bei der 2. Versuchsserie von den Ergebnissen des Stickstofflostversuches absehen, ergibt sich eine deutliche Zunahme der Mutationshäufigkeit in den prämeiotischen Knospen und in denen, die während der Behandlung die Meiosis durchliefen. Der Versuch mit Stickstofflost ist deshalb etwas mit Vorbehalt zu betrachten, weil die toxische Wirkung des Agens derart stark war, daß nur mit großer Mühe einige wenige Blüten bis zur Pollenbildung zu bringen waren. Das waren aber diejenigen, die während der Behandlung wahrscheinlich schon die Meiosis durchlaufen hatten. Deshalb wurde ein Vergleich zwischen den Knospen der Infloreszenzen unmöglich. In der Tabelle 2 wurden die Zahlen für jeden Versuch und jede Knospe einzeln aufgeführt. Es ist fraglich, ob es ratsam ist, die Werte für die einzelnen Knospen zusammenzufassen und die Differenzen

Tabelle 2. 2. Versuchsserie

	m/10 Äthyl- urethan + m/200 KCl		m/100 Äthyl- urethan + m/200 KCl		m/1000 Äthyl- urethan + m 200 KCl		Codein		Alumi- nium- chlorid		Insgesamt aufgezeigte F_2 -NK	Ins- gesamt		%	P
	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nichtspalt. NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK		spaltende NK	nichtspalt- tende NK		
1. Knospe	4	81	6	194	3	47	2	52	—	25	414	15	399	3,7	}0,015 }0,018 }0,024
2. Knospe	10	144	8	22	12	89	5	73	10	134	507	45	462	8,8	
3. Knospe	12	119	10	166	6	71	2	56	13	156	611	43	568	7,1	
4. Knospe	6	66	9	100	7	67	—	27	2	54	338	24	314	7,1	

3. Versuchsserie

	Codein		Alumi- nium- chlorid		Thymo- nuklein- säure		Aqua dest.		Insgesamt aufgezeigte F_2 -NK	Ins- gesamt		%	P
	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK	spaltende NK	nicht- spaltende NK		spaltende NK	nicht- spaltende NK		
1. Knospe	3	87	—	24	3	73	2	121	313	8	305	2,6	}0,055 }0,11 }0,06
2. Knospe	4	75	3	61	4	87	7	124	367	20	347	5,4	
3. Knospe	6	53	4	35	6	119	4	123	348	18	330	5,2	
4. Knospe	—	—	3	28	—	45	3	32	111	6	105	5,4	

zwischen diesen Summen zu vergleichen. Es ist bei der Entfernung der einzelnen Knospen nach der Applikation nicht möglich, immer das gleichalte Entwicklungsstadium als 1. Knospe zu haben. Es kann ohne weiteres geschehen, daß die 1. Knospe der einen Pflanze dem Entwicklungsstadium der 2. Knospe einer anderen entspricht. — Andernfalls müßte man jede einzelne Pflanze aufführen, das würde aber zu umfangreiche Tabellen ergeben. Die Tabelle 2 ergibt trotzdem die Anhaltspunkte, die eine Beurteilung der Chemikalienwirkung auf die Chromosomen in gewissen Knospenstadien ermöglicht. In der 2. Versuchsreihe ist die Zunahme spaltender Nachkommenschaften in den jüngeren Knospenstadien sehr gut gesichert. Dies läßt wohl den Schluß zu, daß die 1. Knospe während der Applikation die Meiosis schon durchlaufen hatte. Die Chemikalienwirkung ist am größten, wenn diese während der Kerneröffnung oder kurz vor dieser zu dem generativen Gewebe gelangen (vgl. SAUERLAND 1956). Ob nun hier die Agenzien direkt an den offen in den Pollenmutterzellen liegenden Chromosomen angreifen oder über das Cytoplasma, wird wohl nicht so ohne weiteres zu klären sein. Nicht ganz so gut gesichert sind die Differenzen der 3. Versuchsserie. Lediglich die 4. Knospe zeigt einen höheren Prozentsatz spaltender Nachkommen. Die Prozentsätze der ersten 3 Knospen des 3. Versuches entsprechen dem Prozentsatz der 1. Knospe des 1. Versuches. Die Versuche, in denen keine gesicherte Erhöhung der Mutationsrate ermittelt werden konnte, wurden nicht mit in die Tabellen aufgenommen. Für eine genaue Präzisierung der besonders sensiblen Meiosisstadien wäre es unbedingt erforderlich, an diesem Objekt die

gleichen Versuche vorzunehmen, wie es schon an *Lilium candidum* (SAUERLAND 1956) ausgeführt wurde. Leider sind die Chromosomen von *Antirrhinum* für derartige Versuche nicht besonders gut geeignet (vgl. ERNST 1938). Wir müssen uns vorerst bei weiteren Versuchen darauf beschränken, so genau wie möglich auf die Knospengröße im Zusammenhang mit den Entwicklungsstadien der Antheren zu achten.

Verzeichnis der in den Versuchen aufgetretenen Mutanten

2. Versuchsserie

m/10 Äthylurethan + m/200 KCl

9/24	Keimblätter und Laubblätter olivgrün, 50% ¹ (olivacea?)	24/31	picturata
9/39	Laubblätter olivgrün, an der Spitze stumpf abgerundet, im Wuchs kaum zurück (80%)	25/20	eosinea
10/30	decipiens	25/24	nivea
11/15	pumila	26/13	wie 21/17
20/34	aeruginosa	29/7	carnea
21/6	luteovirens	29/20	eosinea
26/12	xantha		
14/3	graminifolia	9/19	Oberlippe verkürzt, Zipfel der Unterlippe abstehend
16/7	filiforma-ähnlich	9/24	depressa
24/4	Schmalblattform	9/26	deformis
9/14	blaß fleischfarbig (rhode?)	16/2	radialis
10/7	unicolor	21/7	longina
10/34	erubescens	25/22	fistulata
20/12	carnea	29/5	hemiradialis
21/2	ähnlich cana	14/16	cupuliformis
21/17	rote Blütenfarbe nur in wenigen, schwachen Streifen an Blütenröhre (tubocolorata?)	17/36	minuta-ähnlich
		18/8	conglutinata

m/100 Äthylurethan + m/200 KCl

32/1	eines der Keimblätter weißlichgrün, wesentlich kleiner als das andere, nahezu normale. Ersteres stirbt ab. Pflanze wächst nach vorhergehender Hemmung normal weiter	31/9	graminifolia
33/13	albovirens	38/2	Schmalblattform, Blätter ledrig, dunkelgrün, Ränder kahnförmig hochgebogen
35/6	nitens	40/17	Schmalblattform
36/19	meline	49/2	filiforme-ähnlich (vgl. BERGFELD 1957)
38/3	xantha	50/36	Schmalblattform
39/3	xantha		
42/44	xantha	35/33	caeca
50/7	Keim- und Laubblätter hellgrün, zierlicher Wuchs, 60%	37/5	Unterlippe samtrot, Gelb durch Rot überdeckt (ähnelt caeca)
50/54	Keimblätter und die ersten Laubblätter weißgelb, Pflanze stirbt ab	40/22	eosinea
		42/37	picturata

¹ Die Prozentzahlen geben jeweils die Wuchshöhe der Mutanten im Vergleich zu der Größe der Normalform während der Entfaltung der ersten Blüten an.

- 42/56 Blüte mit sehr stark verwaschenem, blaßen Rot
 42/64 carnea
 42/78 wie 37/5
 51/3 Blüte zitronengelb, verkürzte Blüte, nur schwacher Rotstreifen am Lippenrand
 31/4 plena
 32/11 lacerata-ähnlich, dunklere Rotfärbung
 37/7 radialis
 42/87 longina
 49/3 Oberlippe verkürzt, Unterlippe häufig bis zur Blütenbasis gespalten
 50/33 hemiradialis
 53/4 deformis
 35/34 diversifolia
 40/13 inhibita
 50/2 solida
 Codein
 56/13 Schmalblattform
 56/15 pannosa
 58/3 Schmalblattform
 59/13 meline
 60/1 wie 32/11
 60/30 Blüte gelb, reduzierte Ober- und Unterlippe, Anthere frei
 60/60 fistulata
 63/5 pannosa-ähnlich
 63/24 kräftigere Rorfärbung, gelbes Knie der Unterlippe scharf gegen Rot abgesetzt
 m/1000 Äthylurethan + m/200 KCl
 68/2 meline
 69/6 albina
 69/7 Blätter grau-grün, hängend, viel Anthocyan auf der Blattunterseite
 71/35 Keim- und Laubblätter hellgrün, Blattränder leicht gewellt (70%)
 72/31 xantha
 78/10 nitens
 88/10 latifolia
 85/12 Schmalblattform
 88/32 Laubblätter lang und schmal, Spitze abwärts gebogen (angustifolia?)
 89/2 Schmalblattform
 71/23 carnea
 72/20 wie 21/17 (tubocolorata?)
 72/28 Blüte schwach rosa (malacea?)
 73/10 Blüte gelb, nur schwach rot überlaufen
 74/10 nivea
 78/7 wie 42/56
 83/16 wie 63/24
 88/36 ähnelt picturata
 71/12 wie 32/11
 71/21 longina
 71/30 sterilis
 72/18 radialis
 85/10 truncata
 88/37 wie 32/11
 88/4 gestauchte Internodien, gegliederte Seitentriebbildung, Blätter nicht merklich kleiner
 88/8 densa
 89/7 festinans
 Aluminiumchlorid
 90/49 Keimblätter mit weißgrünem Rand, Laubblätter hellgrün (60%)
 93/18 nitens
 90/37 Schmalblattform
 90/50 wie 38/2
 105/3 filiforme-ähnlich
 106/5 Laubblätter schmal und stumpf, Blattspitze nach unten eingerollt
 90/18 Blütenröhre rot gefärbt
 90/35 nivea mit gelbem Kniefleck
 90/58 wie 42/56
 93/20 kräftigeres Rot, Blütenzipfel rosa
 102/13 wie 90/35
 103/2 wie 60/30, nur mit schwachem Rotstreifen am Rande der reduzierten Lippen
 100/7 wie 90/35
 105/7 wie 90/35
 107/22 nivea ohne gelben Kniefleck
 90/12 deformis
 90/34 fistulata
 93/26 wie 32/11
 93/28 Unterlippe flach vorgewölbt, wird nicht vollkommen von Oberlippe überdeckt
 95/48 reducta
 98/10 reducta
 102/30 sterilis
 102/64 plena
 107/20 truncata
 102/49 inhibita
 Stickstofflost
 156/24 Keimblätter, gelblich, sterben als Keimlinge
 147/18 wie 90/35
 148/4 wie 90/35
 151/12 caeca

152/6 wie 103/2
157/7 plena

156/2 solida
157/25 solida

148/3 inhibita
151/15 amputata

E/6 carnea
I/17 hemiradialis

Sippe 50

3. Versuchsserie

Aqua dest.
18/12 nitens
24/5 olivgrüne Keim- und Laubblätter,
etwas gedrungener Wuchs (80%)

74/1 plena
72/10 conferta-ähnlich

6/9 Schmalblattform
17/1 ähnelt angustifolia
17/5 graminifolia

Thymonukleinsäure
93/13 Laubblätter hellgrün, am Rand
leicht gewellt (60%)
97/16 Schmalblattform
99/21 wie 36/1

2/4 carnea
5/4 Rot überdeckt Gelb der Blüte
6/1 ähnelt tubocolorata
14/1 nivea (mit gelbem Knie)
22/5 wie 14/1

104/11 nivea (ohne gelbes Knie)
106/5 eosinea
108/5 Rot nur noch in schwachen Streifen
auf den Lippen

1/1 centroradialis

105/5 deformis
113/10 sterilis
99/21 wie 72/10

7/4 gestauchte Internodien (60%), nor-
mal große Blätter

105/15 amputata
109/8 densa
112/11 minuta
113/5 solida

Aluminiumchlorid
33/3 xantha
36/1 hellgrüne Laubblätter (60%)
36/4 xantha

m/100 Morphin
138/9 meline

34/4 wie 6/1
36/6 wie 14/1
41/2 wie 14/1
46/5 nivea (ohne gelben Kniefleck)
41/11 blaßrote Blüte (rubra)
40/9 plena

118/25 carnea
128/6 blaßrote Blüten
128/11 nur noch schwache Rotstreifen an
der Basis der Blütenröhre (tubo-
colorata)
131/6 wie 64/6
118/2 densa

33/4 cupuliformis

m/1000 Morphin
149/8 gelbgrüne Keim- und Laubblätter,
nachgrünend (70%)

Codein
61/13 albina
61/16 meline
71/9 nitens

151/14 graminifolia
142/12 ähnelt carnea
143/12 zitronengelbe Blüte, Lippen ver-
kürzt, Antheren frei
144/8 nivea (mit gelbem Knie)
153/11 Blüte schwachrosa (malacea)
140/8 radialis

72/12 Schmalblattform

62/3 wie 5/4
64/6 Blüte schwachrosa (maculosa)
68/7 carnea
72/1 wie 14/1
74/6 elfenbeinfarbige Blüten, Blüten et-
was kleiner

Sippe 50
L 17/8 graminifolia

65/11 flexuosa
65/24 hemiradialis

L 13/8 wie 153/11
L 16/19 nivea (ohne gelbes Knie)
L 19/7 wie 5/4.

D. Diskussion

1. Die mutagene Wirkung der verwendeten Substanzen

Die ersten Mutationsversuche mit Chemikalien an *Antirrhinum majus* L. wurden 1930 veröffentlicht (STUBBE 1930). Aber schon am Anfang des Jahrhunderts versuchten F. WOLF (1909), E. SCHIEMANN (1912) an *Bacillus prodigiosus* und *Aspergillus niger* sowie T. H. MORGAN (1914) an *Drosophila* durch Chemikalien eine Änderung bestimmter Artmerkmale herbeizuführen. All diese Versuche verliefen jedoch negativ. Auch die Versuche der folgenden Jahre ergaben weder an Tieren noch Pflanzen eindeutige Ergebnisse. Bei Tieren, besonders bei *Drosophila*, wurde die Mutationsforschung durch 2 Kreuzungsmethoden gefördert, der „CLB“- und der „Attached X“-Methoden, die ein relativ einfaches Arbeiten ermöglichen. Bei Chemikalienversuchen an diesem Objekt erbrachten vor allem die Arbeiten von AUERBACH (und Schule) und VOGT (1950) u. a. Erfolge. Bei den höheren Pflanzen war eine erfolgversprechende Beeinflussung der Mutationsrate erst durch eine geeignete Applikationsweise gegeben (vgl. OEHLKERS 1943). Diese ging von der Voraussetzung aus, daß eine unmittelbare Einwirkung der Agenzien während der Gonenbildung, also bei der Meiosis, am effektivsten ist, weil hier die Kerne eröffnet sind, die Chromosomen frei im Zellraum liegen und sich hierbei bedeutende Stoffwechselvorgänge abspielen. Erfolge lassen derartige Versuche aber auch nur dann erwarten, wenn die Substanzen zu den betreffenden Gonotokonten, in unserem Versuch zu den PMZ, gelangen können. Ein Transport innerhalb des pflanzlichen Leistungsgewebes ist ohne weiteres nachweisbar. Die Frage ist nur, wieviel von den applizierten Substanzen durch das Konnektiv zu dem eigentlichen Erfolgsort vordringen kann. Für makromolekulare Substanzen müssen wir uns unter anderem vorerst auf das Beispiel der Fermente verlassen, die, manchmal unter Energieaufwand, in die Zellen aufgenommen werden.

Man erhofft bei Applikationen von Chemikalien während der Meiosis der PMZ, daß die Chemikalien direkt oder indirekt, d. h. entweder mit Chromosomenbestandteilen reagieren oder die Chromosomen über den Stoffwechsel- oder Fermentprozeß beeinflussen. Es ist wiederholt die Ansicht vertreten worden, daß mutagene Agenzien erst auf dem Umweg über den Nukleinsäurestoffwechsel wirken (OEHLKERS 1949, MARQUARDT 1950, DARLINGTON 1951, KELLER 1951, WOLL 1953). Es wurden deshalb schon die verschiedensten Stoffe appliziert. Schwer- und Leichtmetallsalze, Alkaloide, Narkotika und viele andere organische Substanzen mehr. Alle mit dem Ziel, aus ihrer mehr oder weniger mutagenen Wirkung Rückschlüsse auf die chemische Struktur und Beeinflußbarkeit der genetischen Substanz zu erhalten. Es wurden auch chemisch nahe verwandte Stoffe verabreicht, wie in unseren Versuchen das Codein und Morphin (Codein = Monomethyläther des Morphins), in der Hoffnung, daß gleiche Moleküle mit anderen Substituenten eine Wirkungsdifferenz zeigen. In unseren Versuchen besteht tatsächlich eine Differenz bezüglich der mutagenen Wirkung der beiden. Ob das allein auf das an Stelle des H^+ getretenen CH_3 -Ion zurückzuführen ist, soll nicht entschieden werden.

Es sei hier auf die Untersuchungen von ENGEL (1954) an Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba* hingewiesen. Er appliziert unter anderem auch Morphin und Codein und erhielt sowohl durch Morphin wie durch Codein eine Zunahme der Fragmentations- und Achromasierate, wobei aber durch Codein die Achromasierate bedeutend stärker heraufgesetzt wurde als durch Morphin. ENGEL und auch DUSTIN (1939) konstatierten als einen weiteren Effekt des Mitoseablaufs durch Codein eine Mitosehemmung, der dann eine gewisse Förderung folgte. v. THIELE-WINKLER (1955) konnte bei der Untersuchung der Meiosis von *Oenothera* nach Codeinapplikation keine Veränderung der meiotischen Ablaufgeschwindigkeit feststellen. Es wurde dies damit erklärt, daß es bei verschiedenartigem Substrat unterschiedliche Reaktionen geben könnte und ein Vergleich gezogen zu den Befunden LANGENDORFFS (1952), daß Agenzien, die bei Ratten gegenüber Strahlungen eine schützende Wirkung haben, keine solche bei Mäusen zeigen. v. THIELE-WINKLER fand ferner, im Gegensatz zu unseren

Versuchen, daß Codein die durch Röntgenstrahlen induzierten Translokations- und Fragmentationsrate herabsetzt. Bemerkenswert hierzu sind auch die Ergebnisse an *Oenothera* (vgl. LINNERT 1953), in denen dargestellt wird, daß das gleiche Agens unter gleichen Bedingungen bei reziproken Bastardkreuzungen eine verschieden hohe Mutationsrate induziert. Bei einer mutagenen Wirkung eines Agens versucht man natürlich eine mögliche Reaktionsweise zu eruieren. Bei Codein nahm v. THIELE-WINKLER an, daß es über den Nukleinsäurestoffwechsel der Zelle eine verstärkte DNS-Beladung gibt. Orte bevorzugter Fragmentationsbereitschaft sind nach WOLL (1953) diejenigen Stellen in Chromosomen, die sich durch eine geringe Nukleinsäurebeladung auszeichnen. WOLL (1953) und auch frühere Versuche (KIHLMANN 1949, KIHLMANN und LEVAN 1951) zeigten, daß eine Störung der Nukleinsäureverhältnisse tatsächlich Chromosomenmutationen auszulösen vermag. Es ist heute nahezu erwiesen, daß die Desoxyribonukleinsäure (DNS) eine, wenn nicht sogar die genetische Substanz im Zellkern ist. So konnte man nachweisen (BOIVIN, VENDRELY 1948 zit. nach OVEREND und PEACOCKE 1957), daß der DNS-Gehalt in diploiden somatischen Kernen verschiedener Gewebe der gleichen Art konstant ist, und daß in den haploiden Keimzellen die Hälfte dieses Betrages vorliegt. Über die Anordnung der DNS-Moleküle bzw. Nukleotideneinheiten im Chromosom und die gegebenen Möglichkeiten der Beeinflussung derselben sei auf die Arbeit von OVEREND und PEACOCKE (1957) verwiesen.

In unserem Versuch mit Thymonukleinsäure wurde keine besonders gut gesicherte Erhöhung der Mutationsrate erzielt. Dazu ist zu bemerken, daß bei den Versuchen nicht auf das Molekulargewicht der Thymonukleinsäure geachtet wurde. Es ist durchaus möglich, daß sie zu hoch polymerisiert war und schlecht oder gar nicht durch die Zellwände gelangen konnte. Bei dem neuen Versuchsansatz wurde darauf geachtet, daß eine DNS mit möglichst niederem Molekulargewicht verwendet wurde. Hinweise, die auf Störungen des Gleichgewichtes an Nukleinsäuren zurückzuführen sind, finden sich häufiger in der Literatur (v. EULER 1940, KELLER 1951 u. a.). WOLL sieht in einer derartigen Störung durch äußere Einflüsse auch eine Möglichkeit, diese als Ursachen der spontanen Mutationen anzusehen. Vor allem im Zusammenhang mit dem Befund MARQUARDTS (1949), daß das Eiweißabbauprodukt Putrescin sowie Kaltextrakt aus überalterten *Oenotherensamen* mutationsauslösend wirken. Abweichend von den Ergebnissen an *Oenothera* sind auch in unseren Versuchen die Resultate der Morphinversuche. Während bei den *Oenotheren*versuchen eine gut gesicherte Erhöhung der Mutationsrate gefunden wurde, kann man ähnliches bei den *Antirrhinum*-versuchen nicht feststellen. Eine Ursache hierfür kann sein, daß nicht alle Objekte in dem gleichen Maße auf ein Agens ansprechen (vgl. AUERBACH 1950). Dies läßt vermuten, daß der Angriff auf die genetische Substanz über das Cytoplasma erfolgt und nicht direkt an den Chromosomen, deren Hauptbestandteil bei allen höheren Pflanzen DNS ist (vgl. OVEREND und PEACOCKE 1957, McELROY und B. GLASS 1957).

2. Zur Abhängigkeit der mutagenen Wirkung vom Entwicklungsstadium der Pollen

Die Ergebnisse zeigen, daß in dem fertig ausgebildeten Pollen die Chemikalien keinesfalls mehr die Wirkung haben wie in meiotischen oder prämeiotischen PMZ. SAUERLAND (1956) stellte an *Lilium candidum* fest, daß selbst während bestimmter Meiosisstadien die Chromosomen empfindlicher reagieren. Die Induktion von Mutationen in prämeiotischen Zellen ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei der Meiosis dieser Zellen das Agens immer noch vorliegt oder in irgendeiner Form wirksam ist. Es kann natürlich auch sein, daß die Chemikalien schon während der prämeiotischen Teilungen eingreifen, also in den Teilungen, die zur

Bildung der PMZ führen. Während der Meiosis findet aber im Vergleich zu den vorhergehenden mitotischen Teilungen ein bedeutend höherer Stoffwechselumsatz, verbunden mit einem wesentlich höheren Energieverbrauch statt, so daß man wohl annehmen kann, daß sich hierbei die entscheidenden Vorgänge abspielen. Das erklärt dann auch, warum die Agenzien, wenn sie erst nach der Meiosis anlangen, also der Pollen schon weitestgehend fertig ausgebildet ist, keine wesentliche Erhöhung der Mutationen hervorrufen. Ganz abgesehen davon, daß dabei auch noch die Exine und Intine als Hindernis im Wege liegen (vgl. STUBBE 1930).

Eine genaue Erklärung des Zustandekommens der Mutationen, d. h. der Wirkungsweise bzw. der Einwirkungsweise der Chemikalien, kann augenblicklich noch nicht gegeben werden. Die Annahme der Wirkung über den Stoffwechsel oder Fermentprozeß läßt eine leichtere Interpretation zu als die Annahme einer direkten Einwirkung auf die Chromosomen, wie sie AUERBACH (1950) bei Senfgas vermutet. Bei der überaus stark toxischen Wirkung der Stickstofflose ist es durchaus möglich, daß eine alles umfassende Schädigung auftritt.

Zusammenfassung

1. Eine gesicherte Erhöhung der Mutationsrate wurde durch Einwirkung von Codein, Aluminiumchlorid, Thymonukleinsäure während der Meiosis der PMZ hervorgerufen. Dagegen ließ sich eine Erhöhung der Mutationsrate durch Morphin nicht sichern.

2. Die Wirksamkeit der Agenzien ist vom Entwicklungszustand der Pollen bzw. PMZ abhängig. Es wurde eine gesicherte Zunahme von Mutationen in Zellen beobachtet, die während der Applikation die Meiosis durchliefen oder sich kurz vor der Meiosis befanden.

3. Es ergab sich ferner eine gewisse Übereinstimmung der cytologischen, an *Oenothera* und anderen Objekten gefundenen Ergebnisse mit den hier beschriebenen sichtbaren genetischen Mutationen.

4. Die durch Chemikalieneinwirkung erhaltenen Mutanten sind gleich denen, die spontan oder nach Strahlenbehandlung auftreten.

Literatur

- AUERBACH, CH.: Chemical production of mutations. *Nature* (Lond.) **157**, 302 (1946). — Chemically induced mosaicism in *Drosophila melanogaster*. *Proc. roy. Soc. Edinb. B* **66**, 211—222 (1946). — Chemical mutagenesis. *Biol. Rev.* **24**, 355—391 (1949). — Differences between effects of chemical and physical mutagens. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **1950**, 1—23. — Some recent results with chemical mutagens. *Hereditas* (Lund.) **27** (1951). — Variations in the response of *Drosophila* germ cells to mutagens. *Caryologia* (Pisa) **1954**. — AUERBACH, CH., and J. M. ROBINSON: Production of mutations by allyl-isothiocyanate. *Nature* (Lond.) **154** (1944). — The production of mutations by chemical substances. *Proc. roy. Soc. Edinb. B* **62** (1947). — Tests of chemical substance for mutagenic action. *Proc. roy. Soc. Edinb. B* **62**, 284—291 (1947). — The chemical production of mutations. *Science* **105**, 243—247 (1947). — BAUR, E.: Mutanten von *Antirrhinum*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **27**, 241 (1922). Untersuchungen über das Wesen, die Entstehung und die Vererbung von Rassenunterschieden bei *Antirrhinum majus*. *Bibliogr. genet.* ('s-Gravenhage) **4** (1924). — DARLINGTON, C. D.: Nucleic acid and the chromosomes. *Symp. Soc. exp. Biol.* **1**, 252—269 (1951). — DEUFEL, J.: Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan. *Chromosoma* (Berl.) **4**, 611—620 (1952). — DICKEY, F. H., G. H. CLELAND and C. LOTS: The role of organic peroxides in the induction of mutations. *Proc. nat. Akad. Sci. (Wash.)* **35**, 581—586 (1949). — DÖRING, H.: Über den Einfluß der Ernährung auf die Mutationshäufigkeit bei *Antirrhinum*

majus. Ber. dtsch. bot. Ges. **55**, 167—182 (1937). — DUSTIN, A. P.: A propos des applications des poisons carvylastiques à l'étude des problèmes de pathologie expérimentale de cancerologie et d'endocrinologie. Arch. exp. Zellforsch. **22**, 395—406 (1939). — ENGEL, L.: Einfluß verschiedener Alkaloide auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Diss. Freiburg i. Br. 1954. — ERNST, H.: Meiosis and Crossing-over. Zytologische und genetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus*. Z. Bot. **33**, 241—284 (1948). — FISHER, R. H.: Statistical methods for research workers. London: Oliver & Boyd 1938. — GLÄSS, E.: Untersuchungen über die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. **43**, 359—403 (1955). — Untersuchungen über die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. **44**, 1—58 (1956). — HERRIOTT, R. M.: Inactivation of virus and cells by mustard gas. I. Gener. Phepiol. **32**, 221—230 (1948). — JENSEN, K. A., J. KIRK, G. KÖLMARK and M. WESTERGAARD: Chemically induced mutations in *Neurospora*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 245—259 (1951). — JENSEN, K. A., G. KÖLMARK and M. WESTERGAARD: Back-mutations in *Neurospora crassa* induced by diazomethane. Hereditas (Lund) **35**, 521—525 (1949). — KIHLMANN, B.: The effect of purine derivatives on chromosomes. Hereditas (Lund) **35**, 393—396 (1949). — KIHLMANN, B., and A. LEVAN: The cytological effect of coffein. Hereditas (Lund) **37**, 382—388 (1951). — KÖLMARK, G.: Differential response to mutagens as studied by the *Neurospora* reverse mutation test. Hereditas (Lund) **39**, 270—276 (1953). — KÖLMARK, G., and M. WESTERGAARD: Further studies on chemically induced reversions at the aderine locus of *Neurospora*. Hereditas (Lund) **39**, 209, 224 (1953). — KUCKUCK, H., u. R. SCHICK: Die Erbfaktoren bei *Antirrhinum majus* und ihre Bezeichnung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **61**, 51—83 (1930). — LANGENDORFF, H.: Das Problem des Reaktionsvorganges bei der biologischen Strahlenwirkung. Strahlentherapie **88**, 164—178 (1952). — LINNERT, G.: Die Einwirkung von Chemikalien auf die Meiosis. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 422—428 (1950). — Der Einfluß von Chemikalien auf Chiasmenbildung und Mutationsauslösung bei *Oenothera*. Chromosoma (Berl.) **5**, 428—453 (1953). — MARQUARDT, H.: Auswertung eines Versuches zur Auslösung von Chromosomenmutationen durch ein Äthylurethan-Kaliumchlorid-Gemisch. Experientia (Basel) **5**, 1—2 (1949). — McELROY, W., and B. GLASS: The chemical basis of heredity. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — MORGAN, T. H.: The failure of aether to produce mutation in *Drosophila*. Amer. Naturalist **48** (1914). — NACHTSHEIM, H.: Die Genetik als Brückenwissenschaft. Jb. 1954 der Max-Planck-Ges. z. Förderung der Wissenschaft. Göttingen 1955. — NEEDHAM, D. M.: The action of mustard gas on enzymes in vitro and in tissues. Biochem. Soc. Symposia **2**, 16—27 (1948). — OEHLKERS, FR.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **81**, 313—341 (1943). — Mutationsauslösung durch Chemikalien. S.-B. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., 9 Abh. **1949**. — Chromosome breaks influenced by chemicals. Heredity **6**, 95—105 (1953). — Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 584—589 (1956). — OEHLKERS, FR., u. G. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 136—156 (1949). — Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 429—438 (1950). — OEHLKERS, FR., u. H. MARQUARDT: Die Auslösung von Chromosomenveränderungen durch Injektion wirksamer Substanzen in die Knospen von *Paeonia tenuifolia*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 299—317 (1950). — OVEREND, W. G., u. A. R. PEACOCKE: Die molekulare Grundlage der Vererbung. Endeavour **16**, 90—98 (1957). — PÄTAU, K.: Eine neue χ^2 -Tafel. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 558 bis 564 (1942). — PULLMANN, A., et B. PULLMANN: Répartition du unage électronique et réactivité chimique des hydrocarbures aromatiques condensés. Experientia (Basel) **2** (1946). — SAUERLAND, H.: Quantitative Untersuchungen von Röntgeneffekten nach Bestrahlung verschiedener Meiosisstadien bei *Lilium candidum* L. Chromosoma (Berl.) **7**, 627—654 (1956). — SCHICK, R., u. H. STUBBE: Die Gene von *Antirrhinum majus*. II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **62**, 249—290 (1932). — III. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **66**, 425 bis 462 (1934). — SCHIEMANN, E.: Mutationen bei *Aspergillus niger* von Tieghem. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **8**, 1—35 (1912). — STADLER, L. J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 6. Internat. Congr. Gen. **1**, 274—294 (1932). — STANGE,

L.: Untersuchungen über den Einfluß von Begleitfaktoren auf die mutationsauslösende Wirkung der Röntgenstrahlen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 429—438 (1951). — STUBBE, H.: Einige Kleinmutationen von *Antirrhinum majus* L. Züchter **6**, 299—303 (1934). — Der gegenwärtige Stand der experimentellen Erzeugung von Mutationen durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Ver. dtsh. Chem. **50**, 241—246 (1937). — Genmutationen. Handbuch der Vererbungswissenschaft. Berlin 1938. — Neue Forschungen zur experimentellen Erzeugung von Mutationen. Biol. Zbl. **60**, 113—129 (1940). — Die Gene von *Antirrhinum majus*. IV. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 401—443 (1941). — STUBBE, H., u. H. DÖRING: Untersuchungen über experimentelle Auslösung von Mutationen bei *Antirrhinum majus*. VII. Über den Einfluß des Nährstoffmangels auf die Mutabilität. Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre **75**, 341—357 (1938). — THIELE-WINCKLER, B. v.: Codein als hemmende Substanz bei der Auslösung von Chromosomenmutationen von *Oenothera*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 338—355 (1956). — VOGT, M.: Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Äthylurethan. Experientia (Basel) **4**, 68—69 (1948). — Analyse durch Äthylurethan bei *Drosophila* induzierter Mutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 324—340 (1950). — Ergänzende Befunde zur mutagenen Wirkung der Urethane bei *Drosophila*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 341—346 (1950). — WOLF, F.: Über Modifikation und experimentell ausgelöste Mutationen bei *Bacillum prodigiosus* und anderen Schisophyten. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **2**, 90—132 (1909). — WOLL, E.: Einwirkung von Nucleinsäuren und ihren Baustoffen auf die Wurzelspitzenmitose. Chromosoma (Berl.) **5**, 391—427 (1953).

Dr. RAINER BERGFELD, Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.,
Schänzlestr. 9/11

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

UNTERSUCHUNGEN AN EINIGEN BLATTFARBENMUTANTEN DER SIPPE 50 VON *ANTIRRHINUM MAJUS* L.*

Von

RAINER BERGFELD

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1957)

A. Einleitung

Vorliegende Arbeit ist eine Fortführung der Untersuchungen an Mutanten von *Antirrhinum majus*, die mit der Bearbeitung der Entwicklungsgeschichte einiger Blüten- und Blattformmutanten begonnen wurde (BERGFELD 1956, 1957). Das Ziel dieser Arbeit ist, durch einen Vergleich der Biologie der einzelnen Mutanten, der Endform der Blätter und Chloroplasten und einem Vergleich des Pigmentgehaltes Aufschlüsse über die Wirkungsweise der veränderten Gene, die ein normales Ergrünen verhindern, zu erhalten. Insbesondere soll darauf geachtet werden, inwieweit diese Eigenschaften durch äußere Einflüsse modifizierbar sind. Es wurde an vielen chlorophylldefekten Pflanzen eine reversible — wohl photochemische — Chlorophyllzerstörung beobachtet, die abhängig ist von der dargebotenen Lichtquantität und -qualität. Die zur quantitativen Bestimmung des Pigmentgehaltes notwendigen Serienmessungen wurden aber erst in neuerer Zeit durch die Einführung spektralphotometrischer Methoden ermöglicht (vgl. RÖBBELEN 1957).

B. Material und Methode

Die untersuchten Mutanten entstammen alle der F_2 eines Mutationsversuches mit Chemikalien (vgl. OEHLKERS 1956), und zwar handelt es sich immer um monohybrid spaltende Formen.

Die Untersuchung der Blattanatomie wurde an frischem Material vorgenommen, während bei den Chloroplasten neben ungefärbten auch mit Rhodamin B und Säurefuchsin (1:1000 in aqua dest. gelöst) gefärbte beobachtet wurden. Ausgewertet und photographiert wurden nur ungefärbte Chloroplasten, und zwar gleich nach der Anfertigung des Präparates, so daß eine eventuelle Quellung der Plastiden als Fehlerquelle nicht in Betracht kommt. Zur quantitativen Bestimmung der Chloroplastenfarbstoffe wurden jeweils 0,01 g frisches Blattmaterial in 10 ml 85%igem Aceton extrahiert. Genauere Methode s. RÖBBELEN (1956). Es wurden hier die Carotinoide im gesamten gemessen, da die Absorptionsmaxima von Carotin und Xanthophyll zu eng beieinander liegen, um eine exakte Trennung der beiden zu ermöglichen (vgl. v. WETTSTEIN 1957). Störend für Messungen in diesem Bereich sind die Anthocyane und Flavonole. Der Gehalt an Flavonolen ist in *Antirrhinum*blättern zu vernachlässigen. Bei einer einigermaßen vorsichtigen Kultur der zur Untersuchung gelangenden Pflanzen, wobei vor allem darauf geachtet werden muß, daß die Temperatur nicht zu tief sinkt, wird in den Blättern die Anthocyan synthese weitestgehend unterdrückt, so daß auch nicht die geringste Spur einer Rotfärbung wahrnehmbar war. Um einer eventuellen Differenz im Pigmentgehalt innerhalb eines Blattes zu begegnen, wurde das Material immer aus der mittleren

* Herrn Prof. Dr. FR. OEHLKERS danke ich für das stete Interesse, welches er der Arbeit entgegenbrachte und für die großzügige Bereitstellung der notwendigen Mittel. Gleichzeitig sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die leihweise Überlassung eines Spektralphotometers gedankt.

Laminaregion entnommen. Niemals wurden Stücke des medianen Leitbündels mit herausgeschnitten. Schwierigkeiten bereiteten bei den Untersuchungen die täglich schwankenden Lichtintensitäten, wodurch, wie später ausgeführt, die Pigmentsynthese beeinflußt wird. Es muß deshalb bei quantitativen Chlorophyllbestimmungen auf das Wetter der Vortage geachtet werden, im Zusammenhang mit der Temperatur. Die Messungen erfolgen gleich nach der Extraktion, so daß eine wesentliche Oxydation von Chlorophyll a zu Phäophytin in der Zwischenzeit nicht die Ergebnisse beeinflussen konnte. Die quantitative Berechnung erfolgt nach der bei RÖBBELEN (1956) angegebenen Methode mit Hilfe des Lambert-Beerscher Gesetzes.

Auf die im Gewächshaus oder im Freiland unter Schattendecken gezogenen Pflanzen entfiel nur $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ des herrschenden Tagelichtes.

C. Ergebnisse

1. Morphologie und Anatomie der Blattfarbmутanten

a) *Antirrhinum majus* L., *mutatio nitens*. Diese Mutante ist im Gegensatz zu manch anderen Blattfarbmутanten bereits in den Keimshalen sehr gut zu erkennen, da sie sich neben

Tabelle 1. Vergleich der Morphologie und Blattanatomie normaler und „nitens“ Blätter (gemessen am 7. 6. 1956)
Die Zahlen stellen Mittelwerte von Meßreihen dar

	Normale Pflanzen	
	Freiland	Schatten
Wuchshöhe	250,0 mm	250,0 mm
Blattlänge + Stiel	42,0 mm	63,0 mm
Blattbreite	21,0 mm	19,0 mm
Blattdicke	0,468 mm	0,375 mm
Dicke des Palisadengewebes	0,225 mm	0,162 mm
Dicke des Schwammparenchyms	0,168 mm	0,162 mm
P : S	1,33 : 1	1 : 1
Länge : Breite der Palisaden	0,069:0,029 mm (2,35:1)	0,054:0,029 mm (1,87:1)
	Mutante nitens	
	Freiland	Schatten
Wuchshöhe	75,0 mm	115,0 mm
Blattlänge + Stiel	40,0 mm	52,0 mm
Blattbreite	16,0 mm	20,0 mm
Blattdicke	0,625 mm	0,256 mm
Dicke des Palisadengewebes	0,350 mm	0,112 mm
Dicke des Schwammparenchyms	0,187 mm	0,101 mm
P : S	1,8 : 1	1,12 : 1
Länge : Breite der Palisaden	0,066:0,029 mm (2,27:1)	0,055:0,031 mm (1,68:1)

Farbe ihrer Keimblätter noch durch ein sehr lang entwickeltes Hypokotyl auszeichnet (STUBBE 1941). Obgleich dadurch die Mutante die normalen Keimlinge um ein mehrfaches überragt, bleibt sie aber im weiteren Verlauf der Ontogenese etwas hinter dem Wachstum normaler Pflanzen zurück (vgl. Tabelle 1).

Ihre Entwicklung ist weitestgehend von den Lichtverhältnissen abhängig, denen die Mutante ausgesetzt ist. Bei hohem Lichtgenuß ist die Entwicklung gehemmter als bei schwachem. Eine optimale Entwicklung wurde bei etwa 10000 Lux beobachtet. Hier hatten die Blätter nahezu die gleiche Farbe wie die unter gleichen Bedingungen gezogenen normalen Pflanzen. Mit zunehmendem höherem Licht-

genuß wurde die Blattfarbe heller, bis sie bei den im Freiland gezogenen Pflanzen nahezu gelb war.

Auch bei den normalen Pflanzen treten — wie Tabelle 1 zeigt — Unterschiede im Blattbau zwischen den Schatten- und Freilandpflanzen auf, jedoch nicht in

einem derartigen Maße wie bei dieser Mutante. Die geringere Wuchshöhe bei den Freilandindividuen der Mutante ist auf kürzere Internodien zurückzuführen, denn sowohl die im Freien gezogenen wie die im Schatten gehaltenen hatten zu dem Zeitpunkt der Messung gleich viele Blattwirtel voll entfaltet. Alle Schattenpflanzen, auch die der normalen Formen, haben eine geringere Blattdicke, die bei beiden vor allem auf eine reduzierte Länge der Palisadenzellen zurückzuführen ist. Hinzu kommt noch die wesentlich stärkere Ausbildung der Kutikula bei allen Freilandpflanzen. Die im vollen Tageslicht gezogenen Mutanten entwickeln sich zu Kümmerformen. Nahezu die gesamte Assimilationsleistung kommt den Plastiden des Schwamm-parenchyms zu, die nur $\frac{1}{4} - \frac{1}{5}$ der Gesamtplastidenmenge eines Blattes ausmachen.

Diese Plastiden sind nur deshalb lebensfähig, weil durch das plastidenarme Palisadengewebe doch soviel Licht absorbiert wird, daß es nicht mehr zerstörend auf dieses wirkt. Setzt man nämlich die Blattunterseite einem genügend starken Licht

aus, so degenerieren auch hier die Plastiden. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß bei intensiver Sonnenbestrahlung die Blätter fast nichts mehr assimilieren, was ein Absterben des Blattes und meist auch der gesamten Pflanze zur Folge hat.

b) *Antirrhinum majus* L., *mutatio meline*. Die zweite der untersuchten Mutanten war die Mutante *meline* (beschrieben von R. SCHICK und H. STUBBE 1932). Sie zeichnet sich vor allem dadurch aus, daß die ursprünglich nahezu zitronengelben Blätter später ergrünen. Letzteres konnte aber bei unseren Versuchen nur bei den im Freiland gezogenen Pflanzen beobachtet werden, dagegen behielten die im Schatten gehaltenen immer eine ziemlich gelbliche Farbe bei. Im Freien ergrünen die Blätter von der Blatthasis her. Später angelegte Blätter sind schon in jungen Stadien grün. Bei ihnen ist eine Gelbfärbung nicht mehr wahrnehmbar. Die Mutanten, sowohl die im Schatten gezogenen wie die im Freiland gehaltenen, blieben sehr stark in der Entwicklung zurück. Nachdem die Pflanzen etwa 4 Wochen im Freiland standen, kam zwischen schattierten und unschattierten eine Differenz in der Blattaufärbung und -entwicklung deutlich zum Vorschein. Die schattierten Pflanzen kümmernten noch stärker als die Freilandpflanzen, während bei letzteren die Blätter sehr bald eine deutliche Grünfärbung zeigten, vor allem an der Basis und längs der Nervatur waren die Blätter der dunkler gehaltenen Pflanzen verwaschen gelblich mit nur ganz schwachen grünen Regionen an der Blattbasis und längs der Nerven. Sämtliche im Schatten kultivierten Pflanzen starben bald ab, während die Freilandpflanzen, obgleich sie stark wuchsgehemmt waren, ohne weiteres zur Blüte gelangten. Allerdings entwickelten sie nur eine sehr kleine Infloreszenz mit 3–5 Blüten.

Rein morphologisch zeigen sich zwischen den unter verschiedenen Bedingungen gezogenen Pflanzen keine Differenzen. Aber bemerkenswert ist, daß die Blätter der Schattenpflanzen durchweg an Blattrand- und spitze Nekrosen aufweisen, die sich sehr schnell ausbreiteten und ein Absterben der Blätter und Pflanzen zur

Tabelle 2. Vergleichende Messungen zur Anatomie des Laubblattes der Mutante *meline* (vgl. hierzu Tabelle 1)

	Mutante <i>meline</i>	
	Freiland	Schatten
Wuchshöhe	30,0 mm	29,0 mm
Blattlänge	25,0 mm	28,0 mm
Blattbreite	11,0 mm	13,0
Blattdicke	0,388 mm	
Dicke des Palisadengewebes	0,170 mm	
Dicke des Schwamm-parenchyms	0,145 mm	
P : S	1,34 : 1	
Länge : Breite der Palisaden	0,062 : 0,031 mm (2,00 : 1)	

Folge hatten. Deshalb konnten für die weiteren Untersuchungen diese Pflanzen nicht mehr verwendet werden.

Die Anatomie des Blattes ist der eines Blattes einer normalen Freilandpflanze weitestgehend gleich, zumindest was die in Tabelle 3 aufgeführten Werte betrifft. Nur die Blattgröße weicht erheblich voneinander ab.

c) *Antirrhinum majus* L., *mutatio flavostriata*. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutanten besitzt die dritte der Mutanten keine homogen gefärbten Blätter, sondern sie ist gescheckt, und zwar in der Art wie es KUCKUCK und SCHICK (1930) für die Mutante *flavostriata* beschreiben. Die Blätter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutante haben ebenfalls auf goldgelbem Grund mehr oder weniger große normal grüne Areale. KUCKUCK und SCHICK

führen die Scheckung bei der Mutante *flavostriata* auf Rückmutationen von flast-flast Zellen zu normalen grünen Flast-Flast zurück.

Charakteristisch sind die anatomischen Veränderungen zwischen den hellen und grünen Arealen, und vor allem zwischen den im Schatten und im Freiland gezogenen Pflanzen. Aber hier spielt eine Rolle mit, was schon bei der Mutante *nitens* beobachtet wurde und bei normalen Pflanzen nicht so stark in Erscheinung tritt, die stärkere Ausbildung der Kutikula bei den im Freiland gezogenen Pflanzen.

Tabelle 3. Vergleichende Blattmessungen an Schatten- und Freilandpflanzen der Mutante *flavostriata* (vgl. hierzu Tabelle 1)

	Freilandpflanzen	
	grüne Flecken	helle Flecken
Blattdicke	0,50 mm	0,438 mm
Dicke des Palisadengewebes	0,275 mm	0,192 mm
Dicke des Schwammparenchyms	0,186 mm	0,218 mm
P : S	1,48:1	0,87:1
Länge : Breite der Palisaden	0,058:0,029 mm	0,058:0,020 mm

	Schattenpflanzen	
	grüne Flecken	helle Flecken
Blattdicke	0,275 mm	0,275 mm
Dicke des Palisadengewebes	0,122 mm	0,141 mm
Dicke des Schwammparenchyms	0,128 mm	0,128 mm
P : S	0,95:1	1,1:1
Länge : Breite der Palisaden	0,058:0,029 mm	0,061:0,029 mm

zen. Blattgröße und -form zwischen den Schatten- und Freilandformen sind hierbei gleich. Gegenüber den Blättern einer normalen Pflanze sind die der Mutante kleiner und breiter (s. Abb. 1). Im Wuchs bleiben die Mutanten etwa 70—80% hinter den normalen zurück.

Auffallend ist die geringe Blattdicke bei den Schattenpflanzen, die vor allem auf eine geringere Schichtenzahl der Schattenblätter zurückzuführen ist. Die Freilandpflanzen haben durchweg 3—4 Palisadenreihen übereinander, während die Schattenpflanzen nur 2 haben, und zudem ist auch bei den Freilandpflanzen das Schwammparenchym mächtiger ausgebildet.

2. Der Pigmentgehalt der Blätter

Charakteristischer als die morphologischen und anatomischen Differenzen sind für die einzelnen Mutanten ihr Pigmentgehalt und die Veränderungen desselben, sowohl bei den Mutanten wie bei der Normalform, bei verschiedenen Lichtbedingungen. Es ist ein häufig beobachtetes Phänomen, daß zahlreiche „Aurea“-Formen der gärtnerischen Züchtung mehr oder weniger stark, je nach Lichtbedingungen und Vermögen wieder ergrünen können. Bei

vorliegenden Untersuchungen soll neben der mengenmäßigen Veränderung des Pigmentgehaltes vor allem noch festgestellt werden, ob bei diesem Prozeß eines der beteiligten Pigmente bevorzugt oder benachteiligt wird, und in welchem Zusammenhang das geschieht. Soweit nicht anders erwähnt, wurden zu allen Pigmentmessungen voll entwickelte Laubblätter herangezogen, bei denen man annehmen kann, daß sie eine längere Zeit hindurch einen konstanten Pigmentgehalt beibehalten.

Bezüglich des Pigmentgehaltes eines alten schon voll ausdifferenzierten und eines jungen sich im Streckungswachstum befindlichen Blattes, zeigen sich sowohl Differenzen in der Menge der einzelnen Pigmente, wie auch im Verhältnis der einzelnen Pigmente zueinander (vgl. RÖBBELEN 1957).

Es zeigt sich hierbei das Gegensätzliche, daß die jungen Blätter der Mutante *meline* mehr Pigment enthalten als die älteren, während es bei der Mutante *nitens* gerade umgekehrt ist. So wie bei der Mutante *nitens* verhält es sich auch mit den normalen Pflanzen. Auf das Verhalten der Mutante *meline* muß später noch näher eingegangen werden. Tabelle 4 zeigt, daß der Pigmentgehalt stark vom Lichtgenuß abhängig ist. Durchweg ist er bei den

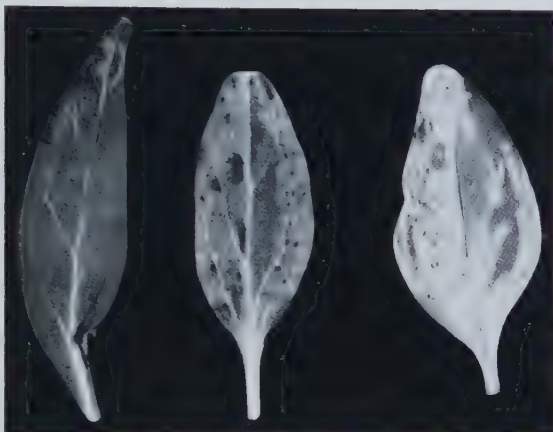


Abb. 1. Von links nach rechts: normales Blatt (Freiland), Blatt einer Schattenpflanze und Blatt einer Freilandpflanze der Mutante *flavostrata* (1,5:1)

Pflanzen der Schattenkulturen höher als bei den im Freiland gezogenen. Eine Ausnahme macht allerdings die Mutante *meline*.

Bei ihr wird das Chlorophyll im Licht nicht zerstört, sondern die Bildung gefördert. Die im Schatten gezogenen Pflanzen der Mutante *meline* starben, wie schon erwähnt, ab. Die in Tabelle 4 angegebenen Werte machen es wahrscheinlich, daß sie wegen einer zu geringen Assimilationsleistung zugrunde gingen. Im Zusammenhang mit diesen sei auch noch auf die in Freilandkultur gezogene Mutante *nitens* hingewiesen, bei der nach einer Schönwetterperiode an den Blättern zahlreiche Nekrosen entstanden, und die Blätter abstarben. Ein Vergleich des Gesamtpigmentgehaltes der Schattenpflanzen der Mutante *meline* und der Freilandpflanzen der Mutante *nitens* erweckt den Anschein, als ob ein Mindestpigmentgehalt für das Existenzminimum der *Antirrhinum*-Pflanze um 900 γ /g Frischgewicht liege, und zwar bei einem nahezu normalen Verhältnis der einzelnen Pigmente zueinander. Bestimmtes darüber zu sagen, erlauben diese Messungen nicht.

Bei der lichtbedingten Schwankung des Pigmentgehaltes zeigt es sich, daß hierbei vor allem Chlorophyll betroffen wird, weniger die Carotinoide. Und zwar wird bei der Zerstörung von Chlorophyll durch Licht vor allem das Chlorophyll a betroffen. Chlorophyll b wird aber auch bei normalen Pflanzen und bei der Mutante *flavostrata* in ziemlichen Mengen mit abgebaut, aber es scheint nicht so sensibel gegenüber dem Licht zu sein. Auffällig sind in diesem Zusammenhang

Tabelle 4. Vergleich des Pigmentgehaltes der einzelnen Mutanten in Schatten- und Freilandkulturen nach einer Regen- und einer Schönwetterperiode
Pigmentgehalt angegeben in γ/g Frischgewicht

	Chlorophyll			Caro- tinoide	$\frac{a + b}{c + x}$	Gesamt- pigment- gehalt
	a	b	a/b			
Blattpigmentgehalt: a) Nach einer Regenperiode						
Normale Pflanzen						
Schatten	1715	1014	1,68	312	8,7	3041
Freiland	1237	753	1,64	234	8,52	2224
Mutante <i>nitens</i>						
Schatten	694	413	1,68	112	9,89	1219
Freiland	452	507	0,9	139	6,9	1098
Mutante <i>meline</i>						
Schatten	382	282	1,35	102	6,5	766
Freiland	575	481	1,19	117	9,05	1173
Mutante <i>flavostriata</i>						
Schatten:						
helles Gewebe . . .	634	497	1,42	158	7,15	1289
grünes Gewebe . . .	1692	815	2,06	487	5,3	2994
Freiland:						
helles Gewebe . . .	388	450	0,86	128	6,65	966
grünes Gewebe . . .	1124	622	1,80	260	6,2	2106
Blattpigmentgehalt: b) Nach einer Schönwetterperiode						
Normale Pflanzen						
Schatten	1513	980	1,56	306	8,1	2799
Freiland	1085	420	2,58	250	6,0	1855
Mutante <i>nitens</i>						
Schatten	525	315	1,67	109	7,7	949
Freiland	398	379	1,05	110	7,07	887
Mutante <i>meline</i>						
Schatten	445	240	1,86	136	5,05	821
Freiland	680	410	1,66	150	7,3	1240

Die Messungen der Mutante *flavostriata* nach einer Schönwetterperiode wurden nicht ausgeführt.

die relativ hohen Werte von Chlorophyll b bei den im Freiland gezogenen Pflanzen der Mutante *meline*, die durchaus lebensfähig sind, während die im Schatten kultivierten sehr wenig Chlorophyll b besitzen (vgl. SEYBOLD 1941, RÖBBELEN 1956). Bemerkenswert ist fernerhin, daß die grünen Areale der Mutante *flavostriata* den gleichen Pigmentgehalt haben wie die Blätter normaler Pflanzen.

Da das Ausbleiben der Plastiden und das Wiederergrünen bei den Mutanten *nitens* und *flavostriata* sehr augenscheinlich reversibel ist, lag natürlich nahe, dieses Objekt auch auf eine evtl. tagesperiodische Schwankung des Pigmentgehaltes, wie sie von BUKATSCH (1939) an einigen Pflanzen gefunden wurde, zu prüfen. Die diesbezüglich unternommenen Messungen erbrachten keine gesicherte Veränderung des Pigmentgehaltes innerhalb eines Tages. Als Beispiel seien in Tabelle 5 Messungen an normalen Freilandpflanzen und der Mutante *nitens* aufgeführt.

Wenn man eventuell auch das leichte Ansteigen des Gesamtpigmentgehaltes bis gegen 13 Uhr als eine tagesperiodisch bedingte Änderung ansehen will, so ist die Zunahme keineswegs gesichert, und zudem müßte man mit steigender Lichtintensität gerade das Gegenteil erwarten, nämlich eine Abnahme des Pigmentgehaltes, welches auf Chlorophyllzerstörung zurückzuführen wäre, entsprechend in Blättern der Schatten- und Freilandpflanzen. Eine Änderung des

Tabelle 5. Messungen des Pigmentgehaltes von Laubblättern der Mutante *nitens* und einer normalen Pflanze im Verlauf eines Tages (gemessen in γ /g Frischgewicht)

	Normale Pflanzen					Mutante <i>nitens</i>				
	Chlorophyll		Carotinoide	Gesamt-pigment-gehalt	a/b	Chlorophyll		Carotinoide	Gesamt-pigment-gehalt	a/b
	a	b				a	b			
7 Uhr	1305	691	261	2257	1,89	514	272	150	936	1,89
10 Uhr	1461	760	289	2450	1,93	538	284	141	963	1,89
13 Uhr	1447	754	285	2468	1,92	518	306	209	1033	1,69
16 Uhr	1278	605	244	2127	2,10	472	287	175	934	1,65
19 Uhr	1387	640	293	2320	2,17	460	323	198	981	1,43
21 Uhr	1301	625	251	2177	2,09	470	300	116	986	1,57

Pigmentgehaltes konnte erst über längere Zeitintervalle gesichert werden, und zwar eine Zunahme der Pigmente während einer Regenperiode und eine Abnahme nach mehreren Tagen Sonnenschein. Mit Ausnahme der Mutante *meline*, die sich gerade umgekehrt verhält. Die Differenzen werden natürlich noch größer, wenn konstant weniger oder mehr Licht geboten wird, wie aus den Messungen an Blättern der Schatten- und Freilandkulturen ersichtlich.

3. Die Struktur der Chloroplasten, ihre Größe und Zahl

Die Farbdefekte bei den einzelnen Mutanten haben mehrere Ursachen, wie z. B. Zahl und Größe der Plastiden, Pigmentgehalt derselben usw. RÖBBELEN

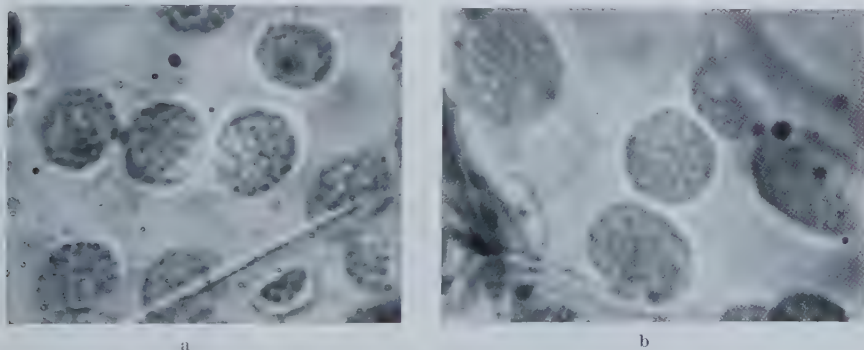


Abb. 2a u. b. Chloroplasten aus Palisadenzellen einer normalen Pflanze (etwa 2000:1). a Deutlich granuliert chloroplasten in den Palisadenzellen einer Freilandpflanze. b Wabenartig granuliert und größere Chloroplasten in den Zellen einer „Schatten“-Pflanze

wies in seiner Arbeit über Blattfarbmutanten bei *Arabidopsis* (1957) darauf hin, daß ein enger Zusammenhang zwischen dem Farbdefekt und der Chloroplastenstruktur besteht. Es erwies sich als notwendig, auch diese hier behandelten Mutanten daraufhin zu untersuchen. Im allgemeinen wurden nur die Chloroplasten des Palisadengewebes miteinander verglichen, weil sie $\frac{3}{4}$ — $\frac{4}{5}$ der gesamten Plastidenmenge ausmachen und diese für die Assimilation ausschlaggebend sind. RÖBBELEN fand bei *Arabidopsis*, daß die Plastiden der Palisadenzellen um 18,1% größer sind als die im Schwammparenchym. Bei *Antirrhinum* fanden wir gerade die umgekehrten Verhältnisse, nämlich, daß in einem normalen Blatt die Chloroplasten das Palisadengewebe um etwa 12% und sogar noch mehr kleiner sind als die des Schwammparenchyms und bei der Mutante *meline* etwa 9%.

Zum Vergleich sind in der folgenden Tabelle die Plastidengröße im Palisaden- und Schwammparenchym aufgeführt. Es zeigt sich dabei, daß nicht unbedingt eine Größendifferenz zwischen den Plastiden der einzelnen Gewebe bestehen muß.

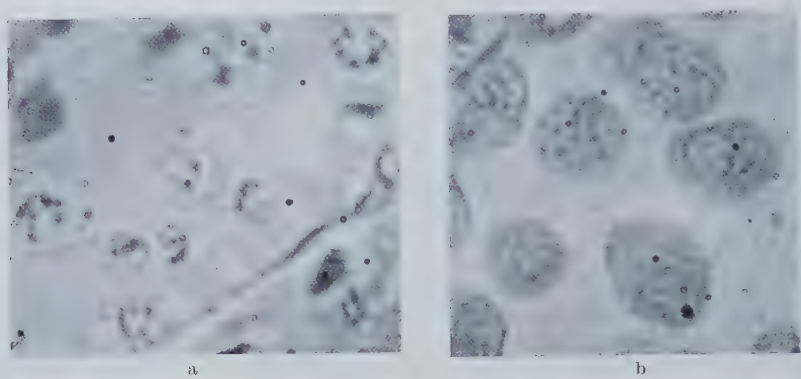


Abb. 3a u. b. a Stark degenerierte Plastiden einer im Freien gezogenen Pflanze der Mutante *nitens*. b Nahezu normal ausgebildete Chloroplasten in den Palisadenzellen einer im Schatten gehaltenen Pflanze der Mutante (etwa 2000 : 1)

Ferner scheinen auch keine direkten Beziehungen zwischen Chloroplastengröße und Zahl je Zelle zu bestehen. In einer Palisadenzelle eines normalen Blattes, ganz gleich ob es aus Schatten- oder Freilandkulturen stammt, sind durchschnittlich 54 Chloroplasten enthalten.

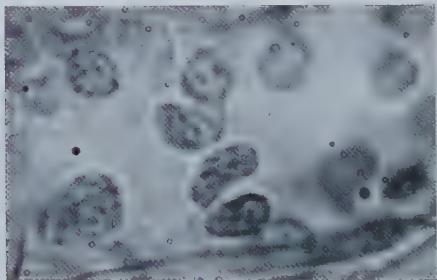


Abb. 4. Relativ kleine und grob granulierte Chloroplasten in den Palisadenzellen einer Freilandpflanze der Mutante *meline* (etwa 2000 : 1)

Tabelle 6. Vergleich der Plastidengröße zwischen Palisaden- und Schwammparenchym

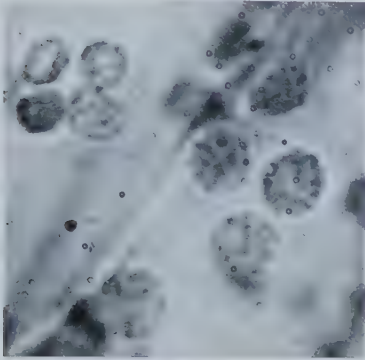
		Ø Palisaden- plastiden mm	Ø Schwamm- plastiden mm
Normale Pflanzen .	Freiland	0,0033	0,0040
	Schatten	0,0040	0,0050
Mutante <i>nitens</i> . .	Schatten	0,0046	0,0046
Mutante <i>meline</i> . .	Freiland	0,0033	0,0040
Mutante <i>flavostriata</i>	Freiland grün	0,0040	0,0046
	Freiland hell	0,0017	0,0020

der normalen Pflanze bestehen erhebliche Differenzen zwischen den Plastiden der Freiland- und Schattenpflanzen. Und dies nicht nur bezüglich der Größe, sondern auch in der Struktur.

Diese Zahl schwankt erheblich mit der Zellgröße und die hier angegebene stellt nur eine einigermaßen angenäherte dar. Diese gleiche Zahl finden wir bei der Mutante *meline*. Die grünen Palisadenzellen der Shecke enthalten durchschnittlich 10 Plastiden weniger und in denen der Mutante *nitens* sind häufig nur 35, welche aber sehr schlecht zu zählen sind, weil sie meist dicht geballt liegen und nicht mehr einzeln zu erkennen sind.

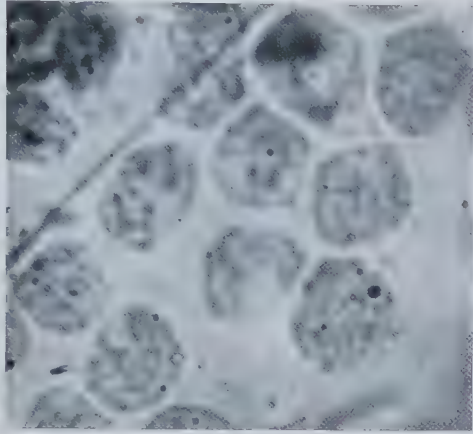
Um so bemerkenswerter ist die Struktur und Größe der Plastiden in den verschiedenen Mutanten und ihre verschiedene Ausgestaltung in Abhängigkeit vom Licht. Selbst schon bei

Es muß aber hier darauf hingewiesen werden, daß die Plastidengröße innerhalb des Palisadengewebes, wie z. B. an den Abbildungen der Mutante *flavostriata* zu erkennen ist (Abb. 5a u. b), sehr stark variieren kann. Diese Photos zeigen Plastiden aus dem gleichen Schnitt in übereinander liegenden Zellschichten. Die kleineren treten in der ersten Palisadenschicht auf, die größeren in der dritten (vgl.



a

Abb. 5a u. b. Plastiden aus Palisadenzellen. a Der 1. und b der 3. Palisadenschicht normal grüner Areale der Mutante *flavostriata* (etwa 2000 : 1)



b

hierzu die Plastidengröße der im Schatten und Freiland gezogenen normalen Pflanzen Abb. 2a u. b). Es scheint also auch die Lichtabsorption innerhalb des Gewebes einen Einfluß auf die Ausbildung der Plastiden zu haben. Dies erklärt auch die größeren Plastiden im Schwammparenchym. Es ist bei den hier beobachteten Plastiden allgemein, daß sie bei einem geringeren Lichtgenuß eine mehr oder weniger starke Hypertelie zeigen. Inwieweit es mit der Assimulationsleistung zusammenhängt, kann nicht gesagt werden, es mag aber möglich sein, daß durch die Oberflächenvergrößerung die geringen Lichtmengen besser ausgenutzt werden.

Abweichend von den übrigen hier untersuchten Blattfarbmutanten verhält sich, wie schon erwähnt, die Mutante *meline*. Die Plastiden der Freilandblätter haben eine ziemlich weitgehende normale Struktur, zumindest was Größe und Granulierung betrifft (Abb. 4). Die Plastiden in den hellen Flecken der Mutante *flavostriata* degenerieren derart, daß sie bedeutend an Durchmesser verlieren, das Stroma farbloser wird und nur noch vereinzelt Grana sichtbar ist. Sehr häufig bilden sich in ihnen Vakuolen (Abb. 6). Derartige Plastiden sind nicht mehr regenerationsfähig.

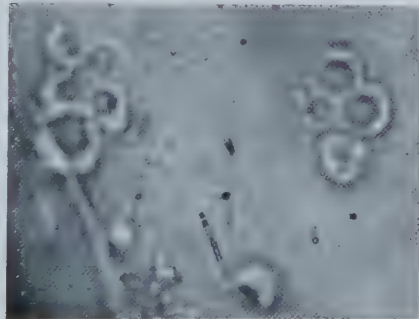


Abb. 6. Vakuolisierte Plastiden in den Palisadenzellen der hellen Stelle einer Freilandpflanze der Mutante *flavostriata* (etwa 2000 : 1)

Die Fähigkeit wieder zu ergrünen besitzen diese Plastiden offensichtlich nur bis zu einer bestimmten Reduktionsstufe. Die sich entwickelnden Plastiden der hellen Areale können

ergrünen, wenn während dieser Periode nur wenig Licht gegeben wird. Sie ähneln dann in ihrer Ausbildung den Plastiden normaler Freilandpflanzen. Sie sind etwas kleiner als diese, sind aber deutlich granuliert (Abb. 7), im Gegensatz zu den Plastiden in den grünen Arealen des gleichen Blattes. Diese weisen eine starke Hypertelie auf, und die Granen heben sich nur

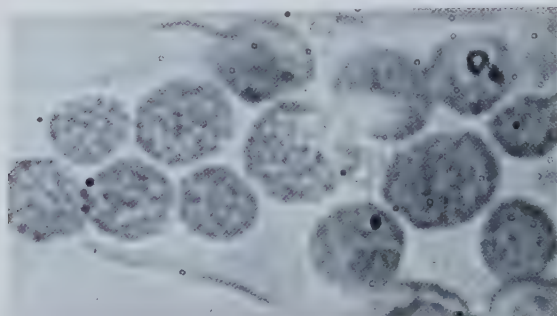


Abb. 7. Chloroplasten in Palisadenzellen grüner Areale einer im Schatten gezogenen Pflanze der Mutante *flavostriata* (etwa 2000 : 1)

schwach vom Stroma ab. Sie ähneln den Plastiden in normalen Schattenblättern. In den normal grünen Zellen einer Freilandpflanze dieser Mutante sind die Plastiden ebenso ausgebildet wie in normalen Freilandblättern.

D. Theoretischer Teil

a) *Genetik*. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutanten traten alle in der F_2 eines Chemikalienversuches in einem exakten 3:1-Verhältnis auf. Die Abweichungen der Spaltungszahlen lagen alle noch innerhalb des zweifachen mittleren Fehlers. Ein Rezessivenausfall, wie ihn GUSTAFSSON (1940) an strahleninduzierten Blattfarbmутanten von Gerste genauer analysierte, konnte nicht festgestellt werden. Wohl auch infolge des geringen Zahlenmaterials. Um eine bessere Klassifizierung der Blattmutanten auch bei *Antirrhinum* zu erhalten, soll versucht werden, bei diesen Mutanten das von GUSTAFSSON (1940) für Blattfarbmутanten von Gerste aufgestellte System zu verwenden. Er unterschied an Blattfarbmутanten die *albinen* Formen, die nahezu weiß sind und keine Grünfärbung erkennen lassen, neben den blaßgelben *xantha*- und den grünlich-gelben *viridis*-Formen. Letztere teilt er noch ein nach ihrem weiteren Verhalten während der Entwicklung

- in *virescens* — die allmählich ergrünen;
- chlorina* — welche die gelblich-grüne Farbe beibehalten
- und *lutescens* — die ausbleichen.

Diese Einteilung deckt sich ziemlich exakt mit den von BAUR (1910) für mendelnde erbliche Buntblättrigkeit aufgestellten Schema. BAUR unterscheidet danach:

- a) rein weißblättrige Sippen (GUSTAFSSON: *albina*),
 - b) gelbblättrige Sippen (GUSTAFSSON: *xantha*), (doppelt rezessiv sind sie nach BAUR letal),
 - c) gelb-grüne *chlorina*-Sippen (GUSTAFSSON: *viridis*),
 - d) gescheckte *variegata*-Sippen (vgl. SCHERZ 1927).
- Letztere führt GUSTAFSSON nicht mit auf.

Die Eingliederung unserer Mutanten wird allerdings insofern erschwert, als die Pigmentsynthese von den Lichtbedingungen abhängig ist. Zudem sind die

Übergänge zwischen den einzelnen Gruppen gleitend. Aber auf Grund ihres Verhaltens in den Freilandkulturen - und für solche wurde wohl dieses Schema aufgestellt — kann man die Mutante *meline* als einen *virescens*-Typ und *nitens* als zur *lutescens*-Gruppe gehörig ansehen. Für die *viridis*-Formen wies GUSTAFSSON einen großen Ausfall von Mutanten nach, wobei er chromosomale Aberrationen verantwortlich machen konnte, was eine Letalität der betroffenen Gonen zur Folge hatte. Auch RÖBBELEN (1957) wies bei *viridis*-Formen von *Arabidopsis*, bis jetzt nur auf Grund abweichender Spaltungszahlen, einen Rezessivenausfall nach. Allerdings waren hier, im Gegensatz zu GUSTAFSSON, auch in geringem Maße Eizellen mit daran beteiligt. GUSTAFSSON (1938) fand in seinen Versuchen, daß die Eizellen voll lebensfähig blieben, was er mit einer Gonenkonkurrenz erklärte. Bei dem zahlenmäßig geringen Material unserer Versuche konnten derartige Phänomene nicht festgestellt werden. Im Zusammenhang mit den zwei oben erwähnten Mutanten wurde auch noch eine weitere untersucht, die keine homogene Blattfärbung besitzt, sondern gescheckt ist. Diese Blattfarbmутante, die auf gelbem Grund mehr oder weniger große, unregelmäßig umgrenzte Flecken besitzt und mendelt, würde nach RENNER (1935) zu den *albomarmoraten*-Typen zu rechnen sein. Für die Scheckung macht er ein stabiles Zeichnungsgen verantwortlich. BAUR (1910) faßte die Mutanten, die diese Erscheinungsform haben und vor allem auch eine mendelnde Mutante darstellen, als *variegata*-Formen zusammen. Er weist auch darauf hin, daß bei den *variegata*-Pflanzen häufig Rückmutationen zu rein grünen Pflanzen oder Trieben (STUBBE 1942) auftreten können, die dann weiterhin in ihrer Deszendenz rein grün sein können.

b) *Anatomie*. Das Ziel der anatomischen Untersuchungen war nicht eine vollständige Beschreibung des inneren Baues der Blätter zu geben, sondern vielmehr einen Vergleich der chlorophylldefekten Blätter mit normalen. Es wurden vor allem die Blattelemente berücksichtigt, in denen sich die photosynthetischen Vorgänge abspielen. Es ist die Regel, daß chlorophylldefekte Blätter kleiner sind als normale (KÜSTER 1927). Da aber, wie aus Tabelle 1—3 ersichtlich, der Durchmesser der Zellen gleich ist, hier nur an den Palisadenzellen gemessen, ist das auf eine Herabsetzung der antiklinen Teilungen zurückzuführen. Und zwar betrifft es Teilungen, die einmal zur Spreitenbildung führen und auch diejenigen, die das Längenwachstum bedingen. Anders ausgedrückt ist eine geringere Leistungsfähigkeit des meristematischen Gewebes die Ursache. Dies zeigt sich auch in der Wuchshöhe der einzelnen Formen. Man kann diese verminderte Leistungsfähigkeit durchaus parallel setzen dem Pigmentgehalt und über diesen hinaus der Assimilationsleistung. Es sei hierbei nur auf die Mutante *nitens* (Tabelle 5) verwiesen. Nicht so starke Differenzen wie bei den Blattflächen bestehen in der Blattdicke. KÜSTER schreibt, daß die blassen Anteile, er spricht speziell von panachierten Formen, ebenso stark seien wie die grünen, oder schwächer. Im allgemeinen trifft das auch für die homogen bleichen Blätter zu, bezogen auf normal grüne Blätter unter gleichen Bedingungen. Die Blattdicke bei der Mutante *meline* ist weniger geringer als bei normalen, und bei der gescheckten Mutante bestehen geringe Differenzen in der Blattdicke zwischen grünen und hellen Arealen. Es besteht aber diesbezüglich eine Abhängigkeit auch von den Lichtverhältnissen während der Entwicklungszeit eines Blattes. Ist das Blatt in der ersten Zeit einer intensiveren Sonnenbestrahlung ausgesetzt, d. h. erfolgt eine zeitige Chloroplasten-

zerstörung, der Zeitpunkt soll hier nicht genau festgelegt werden, tritt nämlich auch eine Hemmung des Längenwachstums der Palisadenzellen auf. Sie haben dann nahezu eine isodiametrische Gestalt. Fallen aber die ersten Entwicklungsstufen des Blattes in eine Schlechtwetterperiode, d.h. den Chloroplasten wird dadurch eine Entwicklung ermöglicht wie in Schattenkulturen und sie können bis zu einem gewissen Grade ergrünen, ändert sich damit auch die Länge der Palisadenzellen, sie werden größer.

c) *Anthocyanbildung*. Die chlorophylldefekten Blätter sind besonders dann, wenn eine weitgehende Zerstörung der Chloroplasten durch Licht erfolgt ist, besonders prädestiniert für Anthocyanbildung. Diese braucht hierbei nicht nur streng auf die Epidermiszellen der Blattunterseite beschränkt bleiben, sondern kann sich auch auf die der Oberseite erstrecken. Anthocyanbildung erfolgt bei *Antirrhinum* besonders leicht durch eine Kältebeeinflussung, bleibt dann aber hauptsächlich auf die Epidermiszellen der Blattunterseite beschränkt, erst bei stärkerer Kälteinwirkung bildet sich in denen der Oberseite auch Anthocyan, vor allem an der Blattspitze. Eine Anregung zur Anthocyanbildung kann, wie die chlorophylldefekten Mutanten lehren, auch durch Licht erfolgen. Dieses wird aber im normalen Blatt durch die Chloroplasten abgehalten. Die Chloroplasten wirken also genau so wie die Silberflecken bei Begonien (BOPP 1956). Diese Silberflecken wirken als „Schattenwerfer“, unter denen das sonst bei Begonien reichlich vorkommende Anthocyan abgebaut wird.

d) *Chloroplastenpigmente und ihre Beeinflussbarkeit*. Im empirischen Teil wurde eine nähere Bezugnahme der anatomischen Befunde mit der Pigmentmenge, den Verhältnissen der einzelnen Pigmente und der Größe und Struktur der Chloroplasten nicht wahrgenommen. Dies ist aber unerlässlich, weil erst ein Vergleich der Wachstums- und der Photosyntheseleistung mit dem Pigmentgehalt, und ein Vergleich des Pigmentgehaltes mit der Struktur der Chloroplasten Aufschlüsse über die Vorgänge, die einer chlorophylldefekten Mutante zugrunde liegen, ermöglichen.

Es sei aber gleich bemerkt, daß eine eventuelle Parallelität keine kausalen Zusammenhänge zu haben braucht. So braucht eine Veränderung des Pigmentgehaltes (vgl. RÖBBELEN 1956 oder -verhältnisses keine Änderung der Photosyntheseleistung oder des Wachstums zur Folge zu haben (vgl. DAVIS 1952, KANDLER und SCHÜTZ 1956). Verschiedentlich wurden schon, und zum Teil sehr früh, Untersuchungen angestellt, um die Mindestmenge an Chlorophyll zu bestimmen, die zum Leben der betreffenden Pflanze notwendig ist. CORRENS (1919) berichtete von einer *albovariables*-Form von *Capsella bursa pastoris*, die noch bei $\frac{1}{10}$ der Chlorophyllmenge einer normalen Pflanze sich weiterentwickeln konnte, wenn auch sehr langsam. WHITAKER (1952) beschrieb eine chlorophylldefekte Melone, die bei einem Chlorophyllgehalt von 40% des normalen keine Verminderung der Wachstumsleistung zeigte und durchaus zur Blüte gebracht werden konnte. DEMEREC (1936) zog eine *xantha*-Mutante der Gerste, die nur 10% des normalen Chlorophyllgehaltes aufwies, bis zur Blüte. Nun bestehen ja, wie RÖBBELEN (1956) an Mutanten von *Arabidopsis* zeigen konnte, bedeutende Differenzen in dem Chlorophyllgehalt an Pflanzen, die gerade noch leben können und solchen, die bis zur Blüte gelangen. Eine seiner *virescens*-Mutanten (V 18) konnte mit 1,6% der normalen Chlorophyllmenge bzw. 6% der gesamten Pigmentmenge eben noch existieren. Die Keimlinge wurden weitestgehend ausdifferenziert. Ein Wachstum, d. h. die Anlage von Rosettenblättern erfolgte allerdings erst, als der Chlorophyllgehalt 14,2% des normalen erreicht hatte. Um allerdings bis zur Blüte und zur Samenreife zu gelangen, bedurfte eine *chlorina*-Mutante (V 1) 30% der normalen Chlorophyllmenge.

Ferner bestehen offensichtlich erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arten und Pflanzen bezüglich der Mindestmenge an Chlorophyll bzw. Gesamt-

pigmentgehalt, welches sie benötigen um zur Blüte zu kommen. Wenngleich bei unserer Versuchsdurchführung auf diesen Zusammenhang nicht besonders geachtet wurde, so gibt doch z. B. die Mutante *nitens* einige Aufschlüsse. Die in Schattenkulturen gezogenen Pflanzen dieser Mutante bilden, etwas verzögert, eine normale Infloreszenz aus. Anders dagegen die im Freiland gezogenen Pflanzen, die sehr stark in ihrer Entwicklung gehemmt waren. Von diesen legten bis Ende Juli nur 12 von 17 (etwa 70%) Blüten an. Es entwickelten sich aber dabei aber nur 2—3blütige Infloreszenzen. Ein Großteil der bestäubten Blüten war zur Samenreife zu bringen. Dies läßt vermuten, daß zumindest bei dieser Mutante das Minimum an Chlorophyllgehalt erreicht ist, welches eben noch eine Reproduktionsleistung ermöglicht. Es liegt hier um 50% des Normalen. Der Prozentsatz des Gesamtpigmentgehaltes ist nur geringfügig niedriger. Er liegt um 47%.

Auch die Mutante *meline* kann man als Vergleich aufführen (vgl. Tabelle 4). Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Schattenpflanzen dieser Mutante absterben. Betrachtet man den Chlorophyllgehalt dieser Mutanten, so zeigt sich, daß sie nur 29% von normalen Pflanzen hat. Ebenso verhält es sich mit dem Gesamtpigmentgehalt. Also mit knapp $\frac{1}{3}$ der gesamten normalen Chlorophyllmenge ist die Pflanze nicht mehr existenzfähig. Die Freilandpflanzen dieser Mutante haben dagegen 72% des normalen Chlorophyllgehaltes. Der Gesamtpigmentgehalt beträgt bei dieser Mutante etwa 65% des normalen.

NAGEL (1939), MONTFORT und KRESS-RICHTER (1950 und MONTFORT (1952) unterscheiden zwei verschiedene Blatttypen hinsichtlich ihrer Reaktionsweise auf das Licht. Bei den photostabilen Blättern nimmt der Chlorophyllgehalt mit der absorbierten Lichtmenge zu, die Freilandpflanzen haben einen höheren Chlorophyllgehalt als Schattenpflanzen (SEYBOLD 1941, EGGLE 1944, SEYBOLD und EGGLE 1932, 1940). Den zweiten Typ stellen die photolabilen Blätter dar, bei denen starkes Licht hemmend auf die Chlorophyllsynthese wirkt, bzw. einen Abbau vorhandener Chlorophyllmoleküle bedingt. Zu letzteren gehört neben der Mutante *nitens* auch die Normalform von *Antirrhinum majus* und die Mutante *flavostriata*. Bei all diesen genannten Formen besteht nicht nur eine Differenz zwischen den Schatten- und Freilandkulturen, sondern auch bei der gleichen Pflanze in Abhängigkeit vom herrschenden Licht. Bei allen diesbezüglichen Untersuchungen an anderen Objekten wurde festgestellt, daß beim Ausbleichen grüner Blätter, auch bei der herbstlichen Laubblattfärbung (EGGLE 1944, SEYBOLD 1943, MICHAEL 1953, BAUER 1956, RÖBBELEN 1956), die Chlorophylle viel schneller zerstört und abgebaut werden als Carotinoide. Ein gleiches ergibt sich auch bei unseren Versuchen. RÖBBELEN führt noch weiter aus, daß auch die Quotienten a/b und x/c erheblichen Veränderungen unterworfen sind. Auf Grund der Befunde an seinen *Arabidopsis*-Mutanten V 24 und V 25 folgert er, daß bei den für den Pigmentabbau verantwortlichen Vorgängen die einen stärker die anderen weniger stark vom Licht abhängig sind, und daß zuerst die lichtunabhängigen und später erst die lichtabhängigen in den Pigmentabbau eingreifen.

Die Mutante *meline* zeigt gegenüber Licht ein vollkommen anderes Verhalten als die bisher beschriebenen Mutanten und auch die Normalform. Bei ihr nimmt der Chlorophyllgehalt mit dem Licht zu, sie gehört demnach zu den photostabilen Formen. Hier haben die Schattenpflanzen durchschnittlich 37% weniger Chlorophyll als die Freilandpflanzen. Es hat den Anschein, als würde Chlorophyll b

etwas schneller im Schatten abgebaut als a. In allen Fällen ist der a/b Quotient im Schatten größer als im Freiland. Daß Chlorophyll b schneller abgebaut wird als a, ist an und für sich nicht die Regel, wurde aber auch schon von SEYBOLD und EGGLE (1938) und WALLACE und SCHWARTING (1954) beschrieben.

Bei der Bewertung der angegebenen unterschiedlichen Pigmentmengen nach Schönwetter und Regenwetter ist noch eines in Betracht zu ziehen. Die Beziehungen der Chlorophyllsynthese zur Lichtmenge sind ohne Zweifel, aber es kommt eventuell hier noch ein Faktor hinzu, der bei dieser Versuchsanlage nicht zu kontrollieren war, nämlich die Temperatur. HAGER (1957) konnte an Versuchen mit *Veratrum* zeigen, daß bei Temperaturniedrigung der Gehalt an Chlorophyllen und Carotin bedeutend schneller abnimmt als die Xanthophylle. Eine erhebliche Temperatursenkung tritt regelmäßig als Begleiterscheinung des Regens auf, und Differenzen um 10° C wirken sich, wie HAGER zeigen konnte, schon deutlich auf den Pigmenthaushalt aus, wodurch natürlich leicht das $a + b/x + c$ -Verhältnis beeinflußt werden kann.

e) *Struktur der Plastiden.* Die Zytologie der Chloroplasten erweckte schon früh das Interesse vieler. SCHIMPER (1855) und MEYER (1883) beobachteten als erste die inhomogene Struktur der Chloroplasten und prägten den Ausdruck „Grana“. In der Folgezeit wurde eine Strukturierung der Plastiden bestritten, bis erst in den 20er Jahren dieses Jahrhunderts die Befunde unter anderen von NOACK (1927) bestätigt wurden. Auftrieb bekam aber die Plastidenforschung erst durch die Arbeiten von HEITZ (1936) und WEILER (1936), die eine Granastruktur in den Plastiden vieler Blütenpflanzen feststellten. Neuerdings haben diese Arbeiten vor allem durch die Einführung elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden an Bedeutung zugenommen (STRUGGER 1956, STRUGGER und PERNER 1956, v. WETTSTEIN 1956, u. a. m.) und ermöglichen einen Einblick in den Bau der Plastiden. Für solche Untersuchungen dürften Chlorophyllmutanten mit ihren zum Teil verschieden gebauten Chloroplasten von Bedeutung sein. Diese Frage interessiert aber in vorliegender Arbeit nicht so sehr, sondern es soll lediglich die lichtmikroskopisch erkennbare Chloroplastenstruktur in Hinsicht auf Pigmentgehalt und Wachstumsleistung verglichen werden.

Es hat sich gezeigt (vgl. RÖBBELEN 1956), daß es wenig aufschlußreich ist, bei pigmentdefekten Mutanten den Pigmentgehalt bzw. die Produktion und Wachstumsleistung auf die Größe und Zahl der Chloroplasten zu beziehen (vgl. v. EULER 1936, GUSTAFSSON 1942, SCHWARZ 1949). Die Plastidengröße und auch ihre Anzahl je Zelle kann bei Mutanten natürlich von normalen Pflanzen verschieden sein, braucht es aber nicht immer. Ferner läuft häufig mit der Veränderung der Plastidengröße auch eine Strukturveränderung parallel.

Die Größe der Granen und ihre Zahl kann aber auch innerhalb des verschiedenen Gewebes eines Blattes variabel sein. Daß diese auch durch äußere Einflüsse verändert werden kann, wies ABEL (1956) nach. Nach längerer Belichtung des Schwammparenchyms von *Antirrhinum majus*-Pflanzen wurden die Granen in den dort liegenden Chloroplasten kleiner und zahlreicher, wieder in normale Verhältnisse zurückgebracht, nahmen die Plastiden auch ihre ursprünglichen Verhältnisse wieder an, d. h. die Granen wurden größer und weniger. HEITZ (1936) beobachtete, daß die Granen in den Chloroplasten des Schwammparenchyms größer sind als die in denen des Palisadengewebes.

Parallel damit dürfte auch eine Veränderung der Plastidengröße gehen. Die Chloroplasten des Schwammparenchyms sind durchweg größer als die des Palisadengewebes. Es ist naheliegend, dies auf einen geringen Lichtgenuß zurückzuführen. Bei der Mutante *flavostriata* waren schon innerhalb des Palisadengewebes Unterschiede in der Chloroplastenbildung (Abb. 5a u. b) zu beobachten. Das gleiche haben wir bei den Blättern der Schattenpflanzen, sowohl bei normalen wie bei *nitens*. Die Plastiden sind bei diesen wesentlich größer, und die Granen heben sich nicht so deutlich vom Stroma ab. Sobald aber die Plastiden der *nitens*-

Schattenpflanzen mehr Licht erhalten, verkleinern sich die Plastiden, die Granen werden größer und weniger zahlreich (Abb. 5a). Bei dieser Mutante, wie auch in den hellen Flecken der Mutante *flavostriata*, wird durch starkes Licht die Entwicklung der Plastiden unterbrochen und sie degenerieren. Dies ist eine Art, wie die Entwicklung der Plastiden beeinflußt werden kann (vgl. ZIRKLE 1929). Eine zweite ist ein verzögerter Entwicklungsablauf derselben, und zwar so, daß unter anderem die Pigmentsynthese nicht im gleichen Maße mit der Plastidengröße zunimmt (vgl. RÖBBELEN 1957, *virescens*-Mutante V 18). Eventuell liegt etwas ähnliches bei der Mutante *meline* vor. Und schließlich sei noch die letzte Art Entwicklungshemmung erwähnt, nämlich ein vollständiges Blockieren der Entwicklung. Dies ist vor allem bei den *albina*-Mutanten der Fall, die auch bei *Antirrhinum majus* häufiger auftreten und die nur so lang lebensfähig sind, wie die Reservestoffe im Samen ausreichen.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mutanten wurde in den hellen Arealen der Mutante *flavostriata* bei fortschreitender Degeneration als letztes Stadium eine Vakuolisierung der Plastiden beobachtet, und zwar trat nur jeweils eine Vakuole je Plastide auf. Eine derartige Degenerationserscheinung wurde schon vielfach beschrieben (MALY 1951, BERGDOLT 1955, SCHECK 1955). BAUER (1942) und SCHMIDT (1951) erhielten durch Alkaloidbehandlung Vakuolen in den Plastiden. Es wird vermutet, daß die Vakuolenbildung unmittelbar mit der Assimilation zusammenhängt und durch eine Hemmung der Diffusion des Assimilatzuckers durch die Plastidengrenzschicht bedingt ist. LINSER (1957) bekam auch durch Einwirkung von 3-Aminobenzol und 3 (o-Iminoäthyl)-5-Methyltetronsäure eine Vakuolisierung der Plastiden im Zusammenhang mit einer Hemmung der Chlorophyllsynthese. Er versucht die Hemmung, da sie bereits auf geringe Wirkstoffkonzentration hin erfolgt, als eine hormonartige Wirkung aufzufassen. Während eine gewisse Chlorophyllreduktion, wenn sie nicht zu weit fortgeschritten ist, wieder reversibel ist (vgl. RÖBBELEN 1957, V 25, BERGDOLT 1956) ist bei den vakuolisierten Pflanzen nicht mehr möglich.

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde die Anatomie, der Pigmentgehalt und die Struktur der Plastiden dreier Blattfarbmutanten von *Antirrhinum majus* mit der Normalform verglichen.

Die Ergebnisse sind folgende:

1. Das Blattwachstum und das Sproßwachstum der einzelnen Mutanten ist gegenüber der Normalform gehemmt. In Freilandkulturen stärker als in Schattenkulturen.

2. Diese Wachstumshemmungen stimmen überein mit einem entsprechend geringeren Pigmentgehalt.

3. Es wurde der Pigmentgehalt der einzelnen Formen in Schatten- und Freilandkulturen verglichen.

a) Es besteht hierbei eine deutliche Differenz im Pigmentgehalt der Freiland- und Schattenpflanzen, mit dem auch eine verschiedene Gestaltung der Plastiden parallel läuft.

b) Die Normalform von *Antirrhinum majus*, die Mutante *nitens* und die Mutante *flavostriata* gehören zu den photolabilen Pflanzen.

c) Die Mutante *meline* ist eine photostabile Form.

d) Eine tagesperiodische Schwankung des Pigmentgehaltes konnte nicht festgestellt werden.

4. a) Die verschiedene Blattfärbung der Mutanten *nitens* und *flavostriata* sind auf eine durch Licht verstärkte Hemmung der Plastidenentwicklung und nachfolgender Degeneration zurückzuführen.

b) Bei der Mutante *meline* scheint eine verzögerte Plastidenentwicklung die Ursache der abweichenden Blattfärbung zu sein.

5. Die Zusammensetzung der Pigmente ist in den einzelnen Mutanten sehr verschieden. Erhebliche Unterschiede treten vor allem im Chlorophyllgehalt auf.

6. Die Struktur der Plastiden steht in engen Zusammenhang mit der Pigmentbildung.

Literatur

- ABEL, B.: Über die Beeinflussung der Chloroplastenstruktur durch Licht bei *Antirrhinum majus* (haploid). *Naturwissenschaften* **43**, 136—137 (1956). — BAUER, A.: Beiträge zur Pigmentphysiologie der Blätter von *Aurea*-Varietäten. *Beitr. Biol. Pflanz.* **32**, 403—426 (1956). — BAUER, L.: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora (Jena)* **136**, 30—84 (1942). — BAUR, E.: Untersuchung über die Vererbung von chromatophoren Merkmalen bei *Melandrium*, *Antirrhinum* und *Aquilegia*. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **4**, 81—102 (1910). — BECK, A. W.: Pigments formed in etiolated sunflower seedlings. *Protoplasma (Wien)* **28**, 273—282 (1937). — BERGDOLT, B.: Anatomische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen der Panaschierung und anderer Blattmuster bei Araceen. *Z. Bot.* **43**, 309—340 (1955). — BERGFELD, R.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an einigen Blütenformen der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* L. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 784—797 (1956). — Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen verschiedener Blattformmutanten der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* L. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 145—157 (1957). — BOFF, M.: Untersuchungen über die Verteilung und Vererbung von Anthocyan in den Blättern von Begonien. *Planta (Berl.)* **48**, 631—682 (1957). — BUKATSCH, F.: Tagesschwankungen des Blattgrüngehalts alpinen Pflanzen. *Naturwissenschaften* **5**, 263—272 (1939). — COMAR, C. K., and F. P. ZSCHEILE: Analysis of plant extracts for chlorophyll a and b by a photoelectric spectrophotometric method. *Plant Physiol.* **17**, 198—209 (1942). — CORRENS, C.: Vererbungsversuche mit buntblättrigen Sippen. *I. S.-B. preuß. Akad. Wiss.* **34**, 585—610 (1919). — DAVIS, E. A.: Photosynthetic *Chlorella* mutants. *Amer. J. Bot.* **39**, 535—539 (1952). — DEMEREC, M.: Behaviour of chlorophyll in inheritance. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **3**, 80—86 (1935). — DRUMM, K.: Vergleichende Untersuchungen über Etiolement und Pigmentgehalt an chlorophylldefekten und normalen Sprossen von *Tradescantia albiflora* var. *albovittata*. *Planta (Berl.)* **46**, 92—112 (1955). — EGGLE, K.: Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. *Bot. Archiv* **45**, 93—148 (1944). — EUE, L.: Chlorophyllbestimmung und Pfropfversuche bei der *Petunia*-Mutante „*defecta*“. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 429—434 (1953). — EULER, H. v., B. BERGMANN, H. HELLSTRÖM u. D. BURSTRÖM: Konstanz des Chlorophyllgehaltes und Chromatophorendegeneration chlorophyllmutiers Gerstensippen. *Hereditas (Lund)* **21**, 119—128 (1936). — FRANK, S., and A. L. KENNEY: Chlorophyll and carotinoid destruction in the absence of light in seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **30**, 413—418 (1955). — FREY-WYSSLING, A., u. E. STEINMANN: Ergebnisse der Feinbauanalyse der Chloroplasten. *Vierteljahrsschrift. naturforsch. Ges. Zürich* **98**, 20—29 (1953). — FUNAOKA, S.: Beiträge zur Kenntnis der panaschierten Blätter. *Bot. Zbl.* **44**, 343—384 (1924). — GRANICK, S.: Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **2**, 115—125 (1957). — GUSTAFSSON, A.: Studies on the genetic basis of chlorophyll formation and the mechanism of induced mutating. *Hereditas (Lund)* **24**, 33—93 (1938). — The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lunds Univ. Årsskr.* **36**, 1—40 (1940). — The plastid development in various types of chlorophyll mutations. *Hereditas (Lund)* **28**, 483—492 (1942). — HAGER, A.: Chloroplastenfarbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Außenfaktoren. *Z. Naturforsch.* **10b**, 310—312 (1955). — Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen. *Planta (Berl.)* **49**, 524—560 (1957). — HEITZ, E.: Untersuchungen über den Bau der Plastiden I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. *Planta*

Berl.) **26**, 134—163 (1936). — Zur Frage nach der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. **8b**, 43—249 (1953). — Kristallgitterstruktur des Granum junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exp. Cell Res. **7**, 606—608 (1954). — KANDLER, O., u. F. SCHÖTZ: Untersuchungen über die photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorellamutanten und panaschierten Oenotheren. Z. Naturforsch. **11b**, 708—718 (1956). — KOSKI, V. M.: Chlorophyll formation in seedlings of *Zea mays*. Arch. Biochem. **29**, 339—343 (1950). — KUCKUCK, H., u. R. SCHICK: Die Erbfaktoren von *Antirrhinum majus* und ihre Bezeichnung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **56**, 51—83 (1930). — KÜSTER, E.: Anatomie des panaschierten Blattes. In LINSBAUERS Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. 8. Berlin 1927. — LINSER, H.: Zellphysiologische Untersuchungen über die Wirkung von 3-Aminobenzol und 3-(Iminoäthyl)-5-Methyltetronsäure als spezifische Chlorophyllbildungshemmstoffe bei *Elaeagnus angustifolia*. Planta (Berl.) **49**, 498—504 (1957). — MALY, R.: Cytomorphologische Studien an strahleninduzierten konstant abweichenden Plastidenformen bei Farnprothallien. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 447—478 (1951). — MALY, R., u. A. WILD: Ein cytologischer Beitrag zur „Entmischungstheorie“ verschiedener Plastidensorten. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 493—496 (1950). — MENKE, W.: Zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden. I. Z. Naturforsch. **11b**, 215—216 (1956). — MICHAEL, K.: Vergleichende Untersuchungen über die Farbeigenschaften und den Bau der Blätter von Aurea-Varietäten verschiedener Gehölze. Züchter **23**, 296—317 (1953). — MICHAELIS, P.: Modellversuch zur Plastiden- und Plasmavererbung. Züchter **25**, 209—221 (1955). — MONTEVERDE, N., u. W. LUBIMENKO: Untersuchungen über die Chlorophyllbildung bei den Pflanzen. Biol. Zbl. **31**, 481—498 (1911). — MONTFORT, C., J. FELGER u. L. MÜLLER: Zeitphasen im Jahreslauf des lichtökologischen Chlorophyllspiegels beim photostabilen Laubblatt. Beitr. Biol. Pflanz. **29**, 106—128 (1952). — MONTFORT, C., u. J. KRESS-RICHTER: Reversible photochemische Chlorophyllzerstörung in bestimmten Laubblättern von Aurea-Formen und ihre Beziehungen zu Strahlungsklima und Erbgut. Planta (Berl.) **38**, 516—520 (1950). — MUDRACK, K.: Experimentelle Untersuchungen an isolierten Chloroplasten. Protoplasma (Wien) **46**, 556—578 (1956). — Über Größen- und Strukturänderung der Chloroplasten in Rohrzucker und Elektrolytlösungen. Protoplasma (Wien) **47**, 461—477 (1956). — NAGEL, W.: Über die Blattfarbstoffe des Tabakes. Bot. Archiv **40**, 1—57 (1939). — NOAK, K.: Über den biologischen Abbau des Chlorophylls. Biochem. Z. **116**, 165—187 (1943). — NOAK, K., u. W. KIESSLING: Zur Entstehung des Chlorophylls und seiner Beziehung zum Blutfarbstoff. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **182**, 13—40 (1929). — DEHLKERS, FR.: Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 584—589 (1956). — RENNER, O.: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **130**, 218—290 (1935/36). — RÖBBELEN, G.: Über die Protochlorophyllreduktion in einer Mutante von *Arabidopsis thaliana* (L) HEYNH. Planta (Berl.) **47**, 532—546 (1956). — Eine Blattfarbmutante ohne Chlorophyll b von *Arabidopsis thaliana* (L) HEYNH. Naturwissenschaften **44**, 1—3 (1957). — Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L) HEYNH. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 189—252 (1957). — SAGROMSKY, H.: Zur Chlorophyllbildung bei Aureaformen. I. u. II. Z. Naturforsch. **11b**, 548—554, 554—560 (1956). — SCHERZ, W.: Beiträge zur Genetik der Bunthblättrigkeit. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **45**, 1—40 (1927). — SCHICK, R., u. H. STUBBE: Die Gene von *Antirrhinum majus*. II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **62**, 249—290 (1932). — III. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **66**, 425—462 (1934). — SCHIMPER, A. F. W.: Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. Jb. wiss. Bot. **16**, 1—25 (1885). — SCHMIDT, H. H.: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten. I. u. II. Protoplasma (Wien) **40**, 209—238, 507—525 (1951). — SCHÖTZ, FR.: Untersuchungen an panaschierten Oenotheren I. Über die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Chloroplasten in den blassen Arealen einiger Plastidenmutanten und Bastardschecken. Z. Naturforsch. **10b**, 100—108 (1955). — SCHWARTZ, D.: The chlorophyll mutants of maize. Bot. Gaz. **111**, 123—130 (1949). — SEYBOLD, A.: Weist der Chlorophyllgehalt der Blätter Tagesschwankungen auf? Bot. Archiv **43**, 71—77 (1941a). — Über die physiologische Bedeutung der Chlorophyllkomponenten a und b. Bot. Archiv **42**, 254—288 (1941b). — Zur Kenntnis der herbstlichen Laubblattfärbung. Bot. Archiv **44**, 551—568 (1943). — SEYBOLD, A., u. K. EGGLE: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. I. Planta (Berl.) **26**, 491—515 (1937). — II. Planta (Berl.) **28**, 87—123 (1938a). — Zur chromatographischen Methode der Blattpigmente. Planta (Berl.) **28**, 114—118

(1938). — Über die Blattpigmente der Alpenpflanzen. Bot. Archiv **40**, 560—570 (1940). — STRUGGER, S.: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodamin B. Flora (Jena) **131**, 113—128 (1936). — Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Protoplasma (Wien) **43**, 120—173 (1954). — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 177—188 (1956a). — STRUGGER, S., u. E. PERNER: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. Protoplasma (Wien) **46**, 711—742 (1956). — STUBBE H.: Die Gene von *Antirrhinum majus*. IV. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 401—443 (1941). — STUBBE, W.: Erbliche Chlorophylldefekte bei *Oenothera*. Photographie u. Wissenschaft **4**, 3—8 (1955). — STUBBE, W., u. D. v. WETTSTEIN: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera*. Protoplasma (Wien) **45**, 241—250 (1955). — WALLACE, R. H., and A. E. SCHWARTING: A study of chlorophyll in a white mutant strain of *Helianthus annuus*. Plant Physiol. **29**, 431—436 (1954). — WEIER, E.: The structure of the non-starch-containing beet chloroplast. Amer. J. Bot. **23**, 645—652 (1936). — WETTSTEIN, D. v.: Formation of the plastid-structures as affected by mutation in the chlorophyll apparatus. Proc. 8. Internat. Congr. Cell. Biol., Leiden 1954. — Genetics and the submicroscopic cytology of plastids. Hereditas (Lund) **43**, 303—317 (1957). — Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. Exp. Cell Res. **12**, 427—506 (1957). — WHITAKER, T. W.: Genetic and chlorophyll studies of a yellow-green mutant in muskmelon. Plant Physiol. **27**, 263—268 (1952). — WILLSTÄTTER, R., u. A. STOLL: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913. — ZIRKLE, C.: Development of normal and divergent plastid types in *Zea mays*. Bot. Gaz. **88**, 186—203 (1929).

Dr. RAINER BERGFELD, Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br.,
Schänzlestr. 9—11

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen

UNTERSUCHUNGEN ZUR POLLENFERTILITÄT TRISOMER OENOTHEREN

Von

CARL-GEROLD ARNOLD

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 25. Oktober 1957)

I. Einleitung

Trisome Mutanten besitzen die Chromosomenzahl $2n + 1$. Sie produzieren demzufolge zweierlei Gametensorten, und zwar zu gleichen Teilen normale, haploide (n) Gameten sowie disome ($n + 1$) Gameten. Zu den wesentlichsten Eigenheiten trisomer (15-chromosomiger) Oenotheren gehört die Tatsache, daß $n + 1$ Geschlechtszellen nur als Eizellen, dagegen nicht als Pollen zur Befruchtung gelangen. OVEREEM (1921, 1923) konnte beim Studium triploider Oenotheren die interessante Feststellung machen, daß die Eizellen prinzipiell alle Chromosomenzahlen von 7 bis 14 aufweisen können, ohne ihre Lebensfähigkeit einzubüßen, während bei den Pollenkörnern nur diejenigen befruchtungsfähig sind, die 7 oder 14 Chromosomen besitzen. Bisher sind auch nur ganz wenige Fälle bekannt geworden, bei denen es ausnahmsweise einmal zur Übertragung von 8chromosomigen σ Gameten gekommen ist. RENNER (1940) berichtet, daß das eine Exemplar einer *P-dependens* aus der Kreuzung *Oenothera biennis* $\times$ *MP-velutiflava tris. dependens* vermutlich aus einem 8chromosomigen Pollenkorn entstanden ist. MICHAELIS (1928, 1930) benutzte bei Selbstungen der *Oenothera Lamarckiana* und *Oenothera Hookeri* kaltebehandelten Pollen der jeweiligen Mutterpflanze. In der Nachkommenschaft solcher Selbstungen fand er unter anderem einige 15chromosomige Pflanzen, die sicherlich ihre Entstehung disomen Pollenkörnern verdanken. Die geschilderten Beispiele sind aber ausgesprochene Ausnahmeerscheinungen. Uns ist bisher kein einziger Fall innerhalb der Gattung *Oenothera* bekannt geworden, bei dem $n + 1$ Pollenkörner regelmäßig zur Befruchtung gelangen.

Nach der Einteilung von CATCHESIDE (1936), EMERSON (1936), FORD (1936) und RENNER (1949) unterscheiden wir auf Grund ihres genetischen und cytologischen Verhaltens zwei Gruppen trisomer Oenotheren. Es sind dies die additiv-dimorphen Mutanten, die bei Selbstung neben ihresgleichen regelmäßig die diploide Grundform abspalten und die kompensiert-monomorphen Mutanten, die bei Selbstung vollkommen konstant bleiben. Für die letzteren ist charakteristisch, daß der befruchtungsfähige Pollen auch bei Komplexheterozygoten genetisch einheitlich ist. Deshalb eigneten sich solche Formen besonders gut für die Untersuchungen SCHWEMMLEs zur selektiven Befruchtung (z. B. SCHWEMMLE 1949, 1951). SCHWEMMLE benutzte vor allem die monomorphe Trisome *Typ A* ($v \cdot I_A$) der Komplexheterozygote *Oenothera odorata* ($v \cdot I$), bei dem in der Regel im σ Geschlecht nur der normale Komplex v vererbt wird, während der abgeänderte Komplex (I_A) im Pollen inaktiv bleibt (SCHWEMMLE 1956). SCHWEMMLE (1949,

1951) berichtet jedoch, daß in der Kreuzung *Oenothera Berteriana* ($B \cdot l$) $\times$ *Typ A* ($v \cdot I_A$) manchmal auch die Komplexkombination $B \cdot I$ auftritt; in den Aufzuchten des Jahres 1949 beispielsweise mit einer Häufigkeit von 0,8% des Gesamtkapselinhaltes. Das für die Untersuchungen zur selektiven Befruchtung zahlenmäßig enorme Pflanzenmaterial konnte SCHWEMMLE nur bewältigen, in dem er bereits die kleinen Pflanzen in den Töpfen auszählte. Es war deshalb nicht sicher festzustellen, ob es sich hierbei wirklich um normale, unveränderte (14chromosomige) $B \cdot I$ -Pflanzen handelte, was in jenem Zusammenhang auch völlig belanglos war. Jedenfalls stand fest, daß es bei *Typ A* gelegentlich doch zu einer Übertragung eines I - oder I -ähnlichen Komplexes kommt. Neuerdings konnte durch BUCHNER (1956) und DITTMANN (1956) die cytologische Konstitution des *Typ A* aufgeklärt werden. Dabei ermittelten sie unabhängig voneinander unter Zugrundelegung der Chromosomenendenbezeichnung HAUSTEINS (1952) folgende chromosomale Zusammensetzung des Komplexes I_A : 2(I 1)3, 9(I 2)10, 13(I 3)14, 11(I 4)12, 6(I 6)7, 4(I 7)1, 8(v 5)11, 5(v 6)6. Hieraus ist ersichtlich, daß der Komplex I_A nur sechs I -Chromosomen und zwei v -Chromosomen besitzt. Damit ist aber erwiesen, daß in *Typ A* niemals ein normaler 7chromosomiger I -Komplex gebildet werden kann. Es wird vielmehr die Vermutung verstärkt, daß mit einer gewissen Regelmäßigkeit der 8chromosomige Komplex I_A auch im ♂ Geschlecht befruchtungsfähig ist. Da die Übertragung eines ♂ $n + 1$ Gameten in der Gattung *Oenothera* bisher unbekannt war, wurden in dieser Richtung Versuche angestellt, worüber im folgenden berichtet werden soll.

II. Material und Methode

Zu den Untersuchungen wurden die beiden isogamen Komplexheterozygoten *Oenothera odorata* und *Oenothera Berteriana* benutzt, sowie die monomorph-trisomen Mutanten der *Oe. odorata Typ A, B* und *C*.

Die Aufzucht der Pflanzen, die Kreuzungen, die Hypanthien- und Petalenmessungen wurden nach der Methode von SCHWEMMLE (1938) durchgeführt.

Für die cytologischen Untersuchungen wurden junge Knospen in Alkohol:Eisessig (2:1) fixiert und mit Karmin-Essigsäure gefärbt. Die Untersuchung selbst erfolgte nach der Antheren-Quetschmethode von HEITZ (1926).

Für die Pollenkeimversuche in vitro wurde ein Nährsubstrat nach GLENK¹ (noch unveröffentlicht) benutzt. Auch die Methodik der Untersuchungen entspricht der von GLENK.

III. Untersuchungen zum Nachweis eines befruchtungsfähigen $n + 1$ Pollens

Das Ziel der Untersuchungen bestand also darin, die Natur jenes im Pollen gelegentlich aktiven I -ähnlichen Komplexes des *Typ A*, den wir vorläufig mit I_X bezeichnen wollen, aufzuklären. Dabei erschien es am günstigsten, einfach die eingangs erwähnte Kreuzung *Oe. Berteriana* ($B \cdot l$) $\times$ *Typ A* ($v \cdot I_A$) zu wiederholen. Ehe wir aber diese Kreuzungsergebnisse besprechen, soll noch über den Ursprung des *Typ A* und über dessen genetisches Verhalten kurz berichtet werden (s. Abb. 1).

Die trisome Form *Typ A* entsteht nahezu regelmäßig in den Selbstungen der *Oe. odorata* ($v \cdot I$). Als monomorph-trisome Mutante spaltet sie in ihren Selbstungen nicht die diploide Grundform $v \cdot I$ ab, dagegen aber neben ihresgleichen zwei weitere trisome Formen, die SCHWEMMLE (1956) mit *Typ B* und *Typ C*

¹ Herrn Dr. H.-O. GLENK sei für die Bereitstellung des Nährbodens aufrichtig gedankt.

bezeichnet hat. Der *Typ C* entsteht auch in den Selbstungen des *Typ B*, während *Typ C* völlig konstant bleibt. Alle drei Mutanten besitzen nach HAUSTEIN (1956), BUCHNER (1956), und DITTMANN (1956) einen normalen 7chromosomigen *v*-Komplex, während der ursprüngliche Komplex *I* in jeweils unterschiedlicher Weise abgeändert ist. So setzt sich der Komplex *I_A* aus 6 *I*-Chromosomen und 2 *v*-Chromosomen, *I_B* aus 5 *I*- und 3 *v*-Chromosomen und schließlich *I_C* aus 4 *I*- und 4 *v*-Chromosomen zusammen.

Im Jahre 1955 wurde nun die *Oe. Berteriana* (*B · l*) mit *Typ A* (*v · I_A*) gekreuzt, wobei die Vaterpflanze einmal *odorata*-Plasma, das andere Mal *Berteriana*-Plasma besaß. Die Ergebnisse beider Kreuzungen (s. Tabelle 1 und 2) unterscheiden sich nicht voneinander. In beiden Fällen finden wir über 95% *l · v*, während der Rest sich ungefähr gleichmäßig auf die *B · v* und auf die Komplexkombinationen *l · I_X* und *B · I_X* verteilt, die jenen vom *Typ A* übertragenen abgeänderten *I*-Komplex besitzen. Die geringe Häufigkeit der diploiden *B · v* überrascht keineswegs, da nach SCHWEMMLE zwischen *B*-Samenan-

lagen und *v*-Pollenschläuchen praktisch keine Affinität besteht (ARNOLD 1958). Im Gegenteil, die hier ermittelte Häufigkeit von 1% ist erstaunlich hoch.

Ursprünglich wurde vermutet, daß der zuweilen vom *Typ A* (*v · I_A*) übertragene Komplex *I_X* mit *I_A* identisch sei. Um das zu klären, ist 1955 auch die

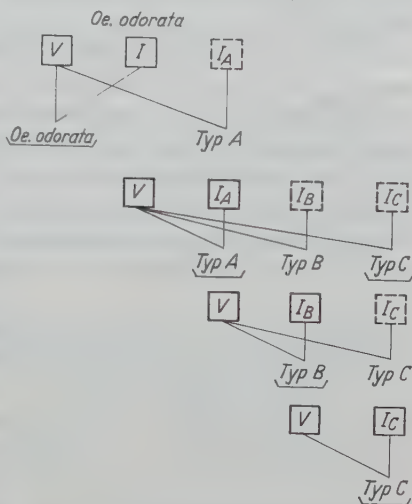


Abb. 1. Die Entstehungsmöglichkeiten der Typen A, B und C. □ Normale Gameten der jeweiligen Pflanzentypen. □ Gameten, die in dem jeweiligen Pflanzentyp erst auf Grund eines non-disjunctions entstehen. *Typ B* und *Typ C* kann u. U. auch direkt aus der *Oe. odorata* entstehen.

Tabelle 1. *B · l × v · I_A* (*odorata*-Plasma)

Kontroll-Nr.	ausgez.	<i>l · v</i>	<i>B · v</i>	<i>l · I_X</i>	<i>B · I_X</i>	Abweicher
A 5627	267	259 = 97,0%	3 = 1,1%	1 = 0,4%	1 = 0,4%	3 = 1,1%

Tabelle 2. *B · l × v · I_A* (*Berteriana*-Plasma)

Kontroll-Nr.	ausgez.	<i>l · v</i>	<i>B · v</i>	<i>l · I_X</i>	<i>B · I_X</i>	Abweicher
A 5629	205	197 = 96,1%	2 = 1,0%	0 = 0,0%	2 = 1,0%	4 = 2,0%

reziproke Kreuzung durchgeführt und 1956 aufgezogen worden. Entsprechend der Tatsache, daß *Typ A* regelmäßig *Typ B* und *Typ C* abspaltet (s. S. 162), sind in der Kreuzung *Typ A × B · l* (s. Tabelle 3) folgende acht verschiedene Formen zu erwarten: einmal die beiden 14chromosomigen *l · v* und *B · v*, sowie die trisomen *l · I_A*, *l · I_B*, *l · I_C* und *B · I_A*, *B · I_B*, *B · I_C*.

Tabelle 3. $v \cdot I_A$ (*Berteriana*-Plasma) $\times B \cdot l$

Kontroll-Nr.	ausgez.	$l \cdot v$	$B \cdot v$	$l \cdot I_A$	$l \cdot I_B$	$l \cdot I_C$	$B \cdot I_A$	$B \cdot I_B$	$B \cdot I_C$	Ab-weicher
A 5631	107	24 = 22,4%	30 = 28,0%	12 = 11,2%	1 = 0,9%	2 = 1,9%	17 = 15,9%	3 = 2,8%	6 = 5,6%	12 = 11,2%

Auf Grund eines eingehenden morphologischen Vergleichs zwischen diesen sechs trisomen Formen der Kreuzung *Typ A* $\times B \cdot l$ einerseits und $l \cdot I_X$ und $B \cdot I_X$ der reziproken Kreuzung $B \cdot l \times \text{Typ A}$ andererseits, konnte festgestellt werden, daß der Komplex I_X mit I_A nicht identisch ist. Dagegen zeigte sich eine völlige Übereinstimmung zwischen $l \cdot I_X$ und $l \cdot I_B$, bzw. zwischen $B \cdot I_X$ und $B \cdot I_B$. Allein die in Tabelle 4 angegebenen Werte über die Länge der Hypanthien

Tabelle 4. Länge der Hypanthien und Petalen in Zentimeter. (Die zur Messung herangezogenen Komplexkombinationen besaßen alle *Berteriana*-Plasma)

	Hypan-thien	Pe-talen		Hypan-thien	Pe-talen
$l \cdot I_A$	3,4	2,5	$B \cdot I_A$	3,1	2,3
$l \cdot I_B$	2,5	2,0	$B \cdot I_B$	2,2	1,8
$l \cdot I_X$	2,5	2,0	$B \cdot I_X$	2,2	1,8
$l \cdot I_C$	2,4	2,1	$B \cdot I_C$	2,1	2,0

und der Petalen weisen schon auf die Identität zwischen den Komplexen I_B und I_X hin.

Um aber ganz sicher zu gehen, wurden die Chromosomenanordnungen in der Diakinese von Pollenmutterzellen der $B \cdot I_X$ ermittelt und mit den Angaben von BUCHNER (1956) verglichen. BUCHNER beobachtete folgende Konfigurationen:

$B \cdot I_A$ 13 + 2 $\odot$; 7 + 6 $\odot$ + 2 $\odot$; 9 + 6 $\odot$

$B \cdot I_B$ 15; 13 + 2 $\odot$; 9 + 6 $\odot$

$B \cdot I_C$ 15; 13 + 2 $\odot$; 11 + 2 $\odot$ + 2 $\odot$; 9 + 6 $\odot$

($\odot$ bedeutet geschlossener Ring, ohne $\odot$ dagegen offene Kette).

Für die $B \cdot I_X$ wurden insgesamt 82 deutbare Diakinesebilder ausgewertet.

Es sind folgende Anordnungen gefunden worden:

$B \cdot I_X$ 15; 13 + 2 $\odot$; in seltenen Fällen 9 + 6 $\odot$.

Damit ist aber wohl eindeutig erwiesen, daß die Komplexe I_B und I_X identisch sind. Wir können deshalb künftig auf die Bezeichnung I_X verzichten.

Auffallend ist, daß von uns auch die Anordnung 9 + 6 $\odot$ wiedergefunden wurde. Diese ist nach den Angaben von BUCHNER nur zu erklären, wenn man annimmt, daß die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 13(B 4)14 und 3(B 2)9 bzw. 2(I 1)3 erstaunlich häufig stattfindet.

Eine eingehende Beschreibung der Komplexkombination $B \cdot I_B$, sowie Abbildungen finden wir bei SCHWEMMLE (1956), so daß an dieser Stelle darauf verzichtet werden kann.

Zusammenfassend können wir feststellen: Die monomorphe Mutante *Typ A* ($v \cdot I_A$) vererbt durch die Eizellen den normalen Komplex v , den Schromosomigen Komplex I_A und auf Grund regelmäßig vorkommender non-disjunctions während der Meiose die ebenfalls Schromosomigen Komplexe I_B und I_C . Im ♂ Geschlecht wird im wesentlichen nur v übertragen, der reichlich gebildete I_A -Pollen bleibt inaktiv. Daneben entstehen infolge dieser non-disjunctions I_B - und vermutlich auch I_C -Pollenkörner. Dabei überrascht die Tatsache, daß bei *Typ A* zumindest gelegentlich die ♂ I_B -Gameten zur Befruchtung gelangen.

Während bei *Typ A* der Komplex I_B nur nach einem non-disjunction und deshalb mit einem sehr geringen Prozentsatz gebildet wird, besitzt der *Typ B*

mit der Konstitution $v \cdot I_B$ zu 50% Gameten mit dem Komplex I_B (s. Abb. 1). Daher ließ sich vermuten, daß wir im *Typ B* eine trisome Mutante besitzen, bei der die $n + 1$ Gameten (hier also die I_B -Gameten) auch über den Pollen in größerer Menge übertragen werden. SCHWEMMLE (1956) konnte in den Kreuzungen *Oe. odorata* $\times$ *Typ B* und $I \cdot I^1 \times$ *Typ B* allerdings keinen Hinweis dafür finden, daß bei *Typ B* I_B -Pollenkörner zur Befruchtung kommen. Dagegen fand er in den Aufzuchten von *Oe. Berteriana* $\times$ *Typ B* einige sog. $B \cdot I$ -ähnliche Pflanzen, die nun wieder die Übertragung des I_B -Komplexes vermuten lassen. Zur Klärung der Frage wurde 1956 *Oe. Berteriana* mit *Typ B* gekreuzt, die Aufzucht erfolgte 1957. Die in der Nachkommenschaft aufgetretenen 1,2% $l \cdot I_B$ und 5,0% $B \cdot I_B$ (s. Tabelle 5) zeigen, daß I_B -Pollenkörner wohl tatsächlich übertragen werden. Andererseits ist die Häufigkeit der I_B -Kombinationen viel zu gering als daß man

Tabelle 5. $B \cdot l \times v \cdot I_B$ (*Berteriana*-Plasma)

Kontroll-Nr.	ausgez.	$l \cdot v$	$B \cdot v$	$l \cdot I_B$	$B \cdot I_B$	Abweicher
A 5731	338	314 = 92.9%	1 = 0,3%	4 = 1,2%	17 = 5,0%	2 = 0,6%

den Schluß ziehen könnte, alle I_B -Pollenkörner seien befruchtungsfähig. Wenn man bedenkt, daß ja die disomen I_B -Körner mit derselben Häufigkeit wie die normalen v -Körner entstehen (höchstens durch die eventuelle Bildung von I_C -Komplexen sind es weniger I_B), so ist wohl die Annahme berechtigt, daß der allergrößte Teil der ♂ I_B -Gameten nicht befruchtungsfähig ist. Allerdings könnte die geringe Häufigkeit von I_B -Kombinationen ihre Ursache auch in einer geringen Affinität zwischen den entsprechenden Samenanlagen und I_B -Pollenschläuchen haben.

Tabelle 6. $B \cdot l \times v \cdot I_C$
(*Berteriana*-Plasma)

Kontroll-Nr.	ausgez.	$l \cdot v$
A 5733	318	318 = 100%

Die Tatsache der Übertragung des Komplexes I_B durch den Pollen des *Typ A* und besonders des *Typ B* führt auch zur Erklärung eines bisher unverständlichen Kreuzungsergebnisses. SCHWEMMLE (1956) kreuzte *Typ C* ($v \cdot I_C$) $\times$ *Typ B* ($v \cdot I_B$) und fand in den Aufzuchten ein Exemplar *Typ B*. Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß *Typ B* im Pollen nur den 7chromosomigen Komplex v überträgt, so ist die Entstehung eines *Typ B* in solchen Kreuzungen freilich unerklärlich. Denn im *Typ C* kann durch ein non-disjunction niemals der Komplex I_B entstehen (BUCHNER 1956, DITTMANN 1956). Das Auftreten des *Typ B* wird aber verständlich, wenn man annimmt, daß ein I_B -Pollenschlauch des *Typ B* eine v -Eizelle des *Typ C* befruchtet hat.

Der Komplex I_A wird also niemals durch den Pollen vererbt, im Gegensatz zum I_B -Komplex. Dieser wird, zwar immer nur in einer recht geringen Häufigkeit, so aber zumindest bei der Mutante *Typ B* regelmäßig übertragen. In keinem Fall konnte bisher festgestellt werden, daß Pollenschläuche mit dem Komplex I_C befruchtungsfähig sind. Durch den Pollen der *Typen A* und *B* wird I_C jedenfalls

¹ $I \cdot I$ ist eine Homozygote der *Oe. odorata* ($v \cdot I$), die nur im *Berteriana*-Plasma lebensfähig ist.

nicht vererbt, obwohl dieser Komplex auch in diesen Typen entsteht (s. Abb. 1). Es lag aber nahe, im Rahmen dieser Untersuchungen zu prüfen, ob der Komplex I_C durch den Pollen des *Typ C* übertragen wird. So wurde 1956 die Kreuzung *Oe. Berteriana* ($B \cdot l$) $\times$ *Typ C* ($v \cdot I_C$) durchgeführt, die Aufzucht erfolgte 1957. Die Auszählungen ergaben 100% $l \cdot v$ (s. Tabelle 6), wodurch hervorgeht, daß der *Typ C* im Pollen einzig und allein den normalen Komplex v vererbt. Es empfiehlt sich daher, in denjenigen Kreuzungsexperimenten, bei denen einförmiger v -Pollen erforderlich ist, nicht die *Typen A* oder *B*, sondern *Typ C* als Pollenspender zu benutzen.

IV. Untersuchungen zur Fertilität einiger $n + 1$ Pollensorten

Pflanzen mit der Chromosomenzahl $2n + 1$ bilden 50% n und 50% $n + 1$ Gameten. Da letztere im ♂ Geschlecht inaktiv sind, müßte bei trisomen Mutanten der Prozentsatz fertiler Pollenkörner im Vergleich zur diploiden Normalform um die Hälfte verringert sein. Tatsächlich ist aber die Pollenfertilität 15chromosomiger Oenotheren oft noch stärker geschwächt, ja es gibt Typen, die nahezu völlig pollensteril sind, wie z. B. *Oe. Lamarckiana lata* (DE VRIES 1901) oder *B. v¹ tenella* (ARNOLD und BINA 1957). In diesen Fällen geht folglich nicht nur der $n + 1$ Pollen zugrunde, sondern auch die an sich funktionstüchtigen n -Gameten. Als Ursache hierfür kann man mit STUBBEE (1934) annehmen, daß bei der Degeneration des disomen Pollens von diesem giftige Stoffe abgegeben werden, die auch auf den normalen haploiden Pollen vergiftend wirken. Des weiteren gibt es zahlreiche trisome Pflanzen, bei denen die Pollenfertilität gegenüber ihren diploiden Grundformen wirklich um die Hälfte vermindert ist. Zu ihnen gehören die 15chromosomigen Mutanten der *Oe. Berteriana*, nämlich *lata*, *tenuis*, *claricoloris* und *angusta* (ARNOLD 1955). Bei diesen gehen also nur die $n + 1$ Pollenkörner zugrunde, die in den reifen Antheren als kleine, zusammengedrückte und inhaltsleere Körner nachweisbar sind. In anderen Fällen dürfte aber zur Zeit der Antherenreife ein großer Teil der Schromosomigen Pollenkörner noch nicht abgestorben sein. So ergaben die Auszählungen des Inhalts reifer Pollensäcke bei der $v \cdot I compacta$ 53,1%, bei der $v \cdot I tenera$ 49,0%, bei der $v \cdot I tenella$ 47,5% fertile² Körner, während die diploide $v \cdot I$ auch nicht mehr als 62,7% besaß (ARNOLD und BINA 1957). Die Inaktivität eines Teiles des disomen Pollens kann sich somit frühestens in einer Keimungsunfähigkeit auf der Narbe äußern.

Bei trisomen Formen von *Datura* wurden die Verhältnisse eingehend von BUCHHOLZ und BLAKESLEE (u. a. 1930, 1932) geprüft. Sie fanden, daß es $n + 1$ Pollensorten gibt, die bereits vor der Antherenreife zugrunde gehen, andere haben die Fähigkeit zur Keimung verloren und wieder andere keimen zwar, doch schwillt der Pollenschlauch schon kurz unterhalb der Narbe an und platzt. Schließlich fanden sie noch eine vierte Gruppe 13chromosomiger Pollenkörner (z. B. der $n + 1$ Pollen der Mutante *Globe*), die nur deshalb nicht oder nur selten zur Befruchtung gelangen, weil ihre Schläuche ein zu langsames Wachstum zeigen und deshalb die Samenanlagen erst dann erreichen, wenn diese von den normalen

¹ Die Komplexkombination $B \cdot v$ geht aus der Kreuzung *Oe. odorata* ($v \cdot I$) $\times$ *Oe. Berteriana* ($B \cdot l$) hervor.

² Die Bezeichnung „fertil“ bezieht sich hier und im folgenden immer nur auf die morphologische Erscheinung der Pollenkörner.

n -Schläuchen bereits aufgesucht worden sind. Wenn man aber weniger Pollenkörner zur Bestäubung auf die Narbe bringt als Samenanlagen zur Verfügung stehen, so kann man die Häufigkeit, mit der solche $n + 1$ Schläuche zur Befruchtung gelangen, erheblich erhöhen.

Schon die Tatsache, daß ein Teil der I_B -Pollenschläuche befruchtungsfähig ist, läßt vermuten, daß zumindest bei *Typ B* zur Zeit der Antherenreife noch keine Degenerationserscheinung des disomen Pollens zu erkennen ist. Die Auszählungen reifer Pollenkörner der *Oe. odorata* sowie der *Typen A, B* und *C* ergaben nach SCHWEMMLE (1956) eine gleiche, bzw. sogar etwas höhere Fertilität

aller trisomen Typen im Vergleich zur diploiden *Oe. odorata* (s. Tabelle 7). Die Angaben SCHWEMMLES beziehen sich auf Formen mit *odorata*-Plasma. Im Jahre 1957 wurde auch die Pollenfertilität für die Formen mit *Berberiana*-Plasma ermittelt (s. Tabelle 7), die grundsätzlich ein gleiches Bild ergaben. Bei der Pollen-

reife ist also morphologisch noch keine Entwicklungshemmung der ♂ $n + 1$ Gameten erkennbar, weder bei *Typ B* noch bei den *Typen A* und *C*.

Die geringe Häufigkeit mit der I_B -Pollenschläuche zur Befruchtung kommen, gab zu der Vermutung Anlaß, daß die I_B -Schläuche, wie gewisse 15chromosomige Pollensorten von *Datura* (s. S. 166), ein recht langsames Wachstum zeigen und somit die Samenanlagen gegenüber ihren haploiden Konkurrenten viel zu spät erreichen. Zur Prüfung dieser Vermutung wurden die Kreuzungen *Oe. Berberiana* ($B \cdot l$) $\times$ *Typ A* ($v \cdot I_A$) bzw. *Typ B* ($v \cdot I_B$) wiederholt, wobei aber nur mit wenig Pollen bestäubt wurde, so daß auch für die nachfolgenden Pollenschläuche

Tabelle 7. Pollenfertilität

	Gezählt	der Formen mit <i>Berberiana</i> -Plasma	sowie mit <i>odorata</i> -Plasma (SCHWEMMLE 1956)
		Fertil	Fertil
<i>Oe. odorata</i> . . .	1985	1258 = 63,4 %	58,7 %
<i>Typ A</i> . . .	991	661 = 66,7 %	58,7 %
<i>Typ B</i> . . .	1919	1375 = 71,7 %	69,9 %
<i>Typ C</i> . . .	1951	1459 = 74,7 %	61,8 %

Tabelle 8. $B \cdot l \times v \cdot I_A$ (*Berberiana*-Plasma) spärlich

Kontroll-Nr.	Ausgez.	$l \cdot v$	$B \cdot v$	$l \cdot I_B$	$B \cdot I_B$	Abweicher
A 5628	253	245 = 96,8 %	3 = 1,2 %	2 = 0,8 %	0 = 0,0 %	3 = 1,2 %

Tabelle 9. $B \cdot l \times v \cdot I_B$ (*Berberiana*-Plasma) spärlich

Kontroll-Nr.	Ausgez.	$l \cdot v$	$B \cdot v$	$l \cdot I_B$	$B \cdot I_B$	Abweicher
A 5732	328	311 = 94,8 %	0 = 0,0 %	0 = 0,0 %	14 = 4,3 %	3 = 0,9 %

noch genügend unbefruchtete Samenanlagen zur Verfügung standen. Die Ergebnisse dieser Kreuzungen (s. Tabelle 8 und 9) unterscheiden sich aber prinzipiell nicht von denen der Normalkreuzungen (s. Tabelle 2 und 5). Auch durch spärliche Bestäubung läßt sich die Anzahl der I_B -Kombinationen nicht erhöhen, ihre geringe Häufigkeit wird also nicht durch ein zu langsames Wachstum der I_B -Pollenschläuche verursacht.

Nachdem es feststand, daß die disomen Pollenkörner der *Typen A, B* und *C* zur Zeit der Antherenreife morphologisch noch keinerlei Degenerationserscheinungen zeigen, daß aber andererseits die $n+1$ Pollenschläuche bis auf einige I_B -Schläuche nicht imstande sind, die Samenanlagen zu erreichen, blieben nur noch zwei Erklärungsmöglichkeiten für das Ausbleiben bzw. für die geringe Häufigkeit trisomer Pflanzen nach Kreuzungen mit den genannten Mutanten als Pollenspende: Entweder die Schromosomigen Pollenkörner haben die Fähigkeit zur

Tabelle 10. *Ergebnisse der Pollenkeimversuche.*
(Keimung in Prozent der fertilen Körner)

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	Durchschnitt
<i>Oe. odorata</i> . .	60	35	25	40
<i>Typ A</i> . . .	20	25	3	16
<i>Typ B</i> . . .	15	30	5	17
<i>Typ C</i> . . .	25	2	6	11

Keimung überhaupt verloren oder das Pollenschlauchwachstum wird noch vor Erreichen der Samenanlagen eingestellt. Da ein kleiner Teil der I_B -Schläuche regelmäßig zur Befruch-

tung gelangt, so war zumindest für den $n+1$ Pollen des *Typ B* letztere Möglichkeit recht naheliegend. Es wurden deshalb mit Pollen der diploiden $v \cdot I$ sowie der *Typen A, B* und *C* (sämtlich mit *Berberiana*-Plasma) auf einem geeigneten Nährsubstrat in vitro Keimversuche durchgeführt. Nach den Angaben von GLENK (noch unveröffentlicht) kann man auf diesem Nährsubstrat eine nahezu 100%ige Keimung erzielen, wenn die pollenspendende Pflanze in Hochblüte steht. Leider hatte bei Durchführung dieser Versuche die Blühfähigkeit der obengenannten Formen bereits merklich nachgelassen, so daß nicht mehr mit einem solch guten Keimungsergebnis gerechnet werden konnte. In unserem Zusammenhang kam es ja auch nur darauf an, ob zwischen der Pollenkeimung der diploiden *Oe. odorata* und der trisomen Mutanten ein Unterschied besteht. Dabei konnten nur gröbere Unterschiede eine Rolle spielen, da die angewendete Methode es nicht gestattet, kleinere Differenzen wahrzunehmen. Die Durchschnittswerte der Tabelle 10 weisen nun eindeutig darauf hin, daß das Keimprozent der *odorata*-Pollen mindestens doppelt so groß ist wie das der 15chromosomigen Typen. Die Verminderung der Pollenkeimung bei *Typ A, B* und *C* um etwa die Hälfte gegenüber der $v \cdot I$ dürfte ihre Ursache sicherlich in einer Keimungsunfähigkeit der $n+1$ Pollenkörner haben, die ja 50% der gesamten Pollenkörner ausmachen. Des weiteren ließ sich kein merklicher Unterschied zwischen der Pollenkeimung des *Typ B* einerseits und der *Typen A* und *C* andererseits ermitteln. Daraus darf man den Schluß ziehen, daß auch der Großteil der I_B -Pollenkörner, der nicht zur Befruchtung kommt, die Fähigkeit zur Keimung verloren hat. Der Prozentsatz derjenigen I_B -Pollenkörner, der noch zu keimen imstande ist und auch die Samenanlagen unbeschadet erreichen kann, ist zu klein, als daß er bei diesen Untersuchungen erfaßt werden konnte.

I_A -, I_B - und I_C -Pollenkörner entwickeln sich also bis zur Antherenreife völlig normal, zumindest sind morphologisch keine Degenerationserscheinungen nachweisbar. Die I_A -, I_C - und der weitaus größte Teil der I_B -Pollenkörner sind jedoch nicht in der Lage, Pollenschläuche zu entwickeln. Die Schläuche derjenigen I_B -Körner, die dazu noch fähig sind, erreichen offenbar die Samenanlagen ohne daß das Wachstum der Schläuche gehemmt ist. Eine auf S. 165 zur Erklärung für die geringe Häufigkeit der I_B -Kombinationen in Erwägung gezogene geringe

Affinität zwischen I_B -Pollenschläuchen und entsprechenden Eizellen ist demnach wohl nicht zutreffend, zumindest aber nicht wirksam.

Zusammenfassung

1. Die Typen *A*, *B* und *C* sind monomorph-trisome Mutanten der *Oenothera odorata*, von denen man erwarten müßte, daß sie nur den normalen 7chromosomigen Komplex *v* im Pollen übertragen.

2. Während dies bei *Typ C* tatsächlich zutrifft, kommt es bei *Typ A* und besonders bei *Typ B* auch zur Vererbung des 8chromosomigen Komplexes I_B , wenn auch immer in geringer Häufigkeit.

3. Bis zur Reife der Antheren entwickeln sich die I_A -, I_B - und I_C -Pollenkörner der genannten Mutanten morphologisch völlig normal.

4. Die Pollenkörner mit den Komplexen I_A und I_C und der größte Teil der I_B -Körner sind nicht in der Lage, Pollenschläuche auszubilden.

5. Die Pollenschläuche der keimfähigen I_B -Pollenkörner erreichen die Samenanlagen offenbar ohne weitere Hemmung ihres Wachstums.

Literatur

- ARNOLD, C.-G.: Genetische und zytologische Untersuchungen an trisomen Mutanten der *Oenothera Berteriana*. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 622 (1955). — Selektive Befruchtung. *Ergebn. Biol.* **20**, 67 (1958). — ARNOLD, C.-G., u. H. BINA: Über 15chromosomige Mutanten der *Oenothera odorata*. *Flora (Jena)* **144**, 537 (1957). — BUCHHOLZ, J. T., and A. F. BLAKESLEE: Pollen-tube growth of the primary mutant of *Datura Rolled* and its secondaries. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **16**, 190 (1930). — Pollen-tube growth in the primary and secondary $2n + 1$ *Daturas*. *Amer. J. Bot.* **19**, 604 (1932). — BUCHNER, E.: Genetische und zytologische Untersuchungen an trisomen Mutanten der *Oenothera odorata*. I. *Flora (Jena)* **143**, 543 (1956). — CATCHESIDE, G.: Origin, nature and breeding behaviour of *Oenothera Lamarckiana* trisomics. *J. Genet.* **33**, 1 (1936). — DITTMANN, C.: Genetische und zytologische Untersuchungen an trisomen Mutanten der *Oenothera odorata*. II. *Flora (Jena)* **143**, 575 (1956). — EMERSON, ST.: The trisomic derivatives of *Oenothera Lamarckiana*. *Genetics* **21**, 200 (1936). — FORD, C. E.: Non-disjunction in *Oenothera* and the genesis of trisomics. *J. Genet.* **33**, 274 (1936). — GLENK, H.-O.: Keimversuche mit *Oenothera*-Pollen in vitro (noch unveröff.). — HAUSTEIN, E.: Die Endenbezeichnung einiger *Oenotheren* aus dem Subgenus *Raimannia*. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 417 (1952). — Zur Cytologie einiger aus der *Oenothera odorata* abgeleiteter Trisomen. *Flora (Jena)* **143**, 385 (1956). — HEITZ, E.: Der Nachweis der Chromosomen. *Z. Bot.* **18**, 625 (1926). — MICHAELIS, P.: Über experimentelle Erzeugung heteroploider Pflanzen bei *Epilobium* und *Oenothera*. *Biol. Zbl.* **48**, 370 (1928). — Über experimentell erzeugte heteroploide Pflanzen von *Oenothera Hookeri*. *Z. Bot.* **23**, 288 (1930). — OVEREEM, C. VAN: Über Formen mit abweichenden Chromosomenzahlen bei *Oenothera*. I. *Beih. bot. Zbl.* **38**, 73 (1921). — Über Formen mit abweichenden Chromosomenzahlen bei *Oenothera*. II. *Beih. bot. Zbl.* **39**, 1 (1923). — RENNER, O.: Zur Kenntnis der 15chromosomigen Mutanten der *Oenothera Lamarckiana*. *Flora (Jena)* **134**, 257 (1940). — Die 15chromosomigen Mutanten der *Oenothera Lamarckiana* und ihrer Verwandten. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 1 (1949). — SCHWEMMLE, J.: Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-*Oenotheren*. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 358 (1938). — Gibt es eine selektive Befruchtung? I. *Biol. Zbl.* **68**, 195 (1949). — II. *Biol. Zbl.* **70**, 193 (1951). — Trisome Mutanten der *Oenothera odorata*. *Flora (Jena)* **143**, 356 (1956). — STUBBE, H.: Studien über heteroploide Formen von *Antirrhinum majus* L. *Planta (Berl.)* **22**, 153 (1934). — VRIES, H. DE: Die Mutationstheorie, Bd. I. Leipzig 1901.

Aus dem Institut für Gärtnerische Pflanzenzüchtung
der Technischen Hochschule Hannover

VARIABILITÄT DER CHROMOSOMENZAHLEN UND ANDERE KERN-
PATHOLOGIEEN IN AEGILOPS TRIUNCIALIS $\times$ TRITICUM AESTIVUM-
BASTARDEN*

Von

G. POHLENDT

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. August 1957)

A. Einleitung

Seit GODRON im Jahre 1854 zum ersten Male die Bastardnatur der spontanen pentaploiden Bastarde zwischen *Aegilops ovata* ($2n = 28$) und *Triticum aestivum* ($2n = 42$) erkannt hatte, sind unzählige Veröffentlichungen über die gleichen Objekte unter den verschiedensten Fragestellungen erschienen. Abstammungsgeschichte, Systematik, Cytologie und Cytogenetik sowie Pflanzenzüchtung waren gleichermaßen an diesem Objekt interessiert. Zwar sind manche dieser Fragen, wie z. B. die Verwandtschaftsverhältnisse im *Triticum-Aegilops*-Kreise, bereits zu einer gewissen Lösung gelangt (LILLIENFELD 1951). Doch andere, wie die von BLEIER (1930) begonnene Auseinandersetzung mit der *Methode* der Genomanalytiker, befinden sich immer noch in vollem Fluß (GAUL 1954). Auch die unter Gesichtspunkten der reinen Cytologie durchgeführten Untersuchungen BLEIERS (1930) erscheinen nach dem heutigen Stande cytologischer Forschung ergänzungsbedürftig zumindest durch Einbeziehung *somatischen* Materials. Dies um so mehr, nachdem unsere Kenntnisse von der Pathologie der Zellteilungen, insbesondere der Mitosen, in den letzten Jahren sowohl von der Erscheinungsform wie von den Ursachen her stark erweitert worden sind (OEHLKERS und LINNERT 1949, 1951; MARQUARDT 1950; WOLL 1953; GLÄSS 1955, 1956). Unter den in diesen Arbeiten herausgestellten Gesichtspunkten ist von einem Vergleich der an somatischem Material gemachten Beobachtungen mit den bisher bekannten und ebenfalls ergänzten Befunden an Pollenmutterzellen eine zwanglosere Deutung der cytologischen Verhältnisse in diesen *Aegilops*-Weizen-Bastarden zu erwarten, als sie für BLEIER (1930) nach ausschließlicher Untersuchung von Pollenmutterzellen ohne diese Kenntnisse möglich sein konnte.

B. Material

Spontane Bastarde: F_1 und F'_2 . Das Material zu der vorliegenden Arbeit stammt aus einem Sortiment von Getreide, das Professor KUCKUCK (1956) von einer Forschungs- und Sammelreise im Iran in den Jahren 1952—1954 mitbrachte. In der Kollektion Nr. 260b von *Aegilops triuncialis* traten nach Aussaat

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

im Iran Abweicher auf, die dem Phänotyp nach und ihrem Fundort nach eindeutig als F_1 -Bastarde zwischen *Aegilops triuncialis* und *Triticum aestivum* erkannt werden konnten. Die Kollektion Nr. 260b von *Aeg. triuncialis* war als Unkraut in einem *Tr. aestivum*-Feld (162 km von Tabriz nach Miami, 1024 m hoch) gesammelt worden. Die phänotypischen Merkmale solcher *Aegilops triuncialis* $\times$ *Tr. aestivum*-Bastarde sind gut bekannt und in der Literatur mehrfach beschrieben und abgebildet worden (z. B. OEHLER 1933). Im Iran setzten diese F_1 -Bastarde spontan eine F'_2 an, von der mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, daß sie durch Rückkreuzung mit Weizen entstanden ist. Selbstungen sind bisher nämlich weder experimentell gelungen noch spontan beobachtet worden. Rückkreuzungen mit *Aegilops* lassen sich zwar *experimentell* erzwingen (OEHLER 1933), doch ist *spontaner* Ansatz bisher nur nach Rückkreuzung mit dem Weizenelter bekannt geworden. Sechs von diesen spontanen F'_2 -Pflanzen konnten bis zum blühhfähigen Alter kultiviert und durch Verklonen mehr als $1\frac{1}{2}$ Jahre am Leben erhalten werden. Sie bildeten zusammen mit zwei F_1 -Bastarden, die in einer Restaussaat der Kollektion 260b in Hannover noch gefunden wurden, das spontane Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit.

Experimentelle Bastarde. Im Laufe der Untersuchungen erschien es wünschenswert, mehr Material, insbesondere auch experimentelle Bastarde zu untersuchen, um den Befunden eine bessere Allgemeingültigkeit zu verleihen. Zu diesem Zweck wurde *Aeg. triuncialis* mit *Tr. aestivum* gekreuzt, und zwar sowohl die Originalherkünfte der Eltern der spontanen Bastarde wie auch *Aeg. triuncialis* und *Tr. aestivum* anderer Herkünfte. Aus diesen Kreuzungen konnten 12 F_1 -Pflanzen erhalten werden.

Im ganzen bestand das untersuchte Material also aus 14 F_1 -Pflanzen und 6 F'_2 -Pflanzen.

C. Methode

Die meisten Präparate besonders von Pollenmutterzellen wurden nach der von ERNST (1938) modifizierten Heitzschen Karminessigsäuremethode hergestellt, wobei es sich wiederum als vorteilhaft erwies (POHLENDT 1942), von überfärbten Objekten auszugehen und diese durch Aufkochen in 50%iger Essigsäure auf die gewünschte Farbstärke zurückzudifferenzieren.

Um wirkliche Befunde von Quetschartefakten unterscheiden zu können und die analysierten Zellen auch im ungestörten Gewebsverband beobachten zu können, wurden auch Paraffinschnitte hergestellt sowie Rasiermesserschnitte, die nur leicht angeklopft statt gequetscht wurden.

Spezifische Schwierigkeiten ergaben sich bei der Untersuchung von oberirdischem vegetativem Gewebe (Spelzenbasen, junge Antheren usw.). Oberirdisches Gewebe weist nicht nur bei den Objekten dieser Arbeit, sondern ganz allgemein im Vergleich zu Wurzelspitzen sehr kleine Zellumen auf. Die Chromosomen erscheinen daher sehr dicht gepackt und haben beim Quetschen nicht die gleichen Ausbreitungsmöglichkeiten wie in Wurzelspitzenzellen. Erschwerend kommt hinzu, daß sowohl die *Aegilops*- wie auch die *Triticum*-Chromosomen eine beachtliche Länge aufweisen. Als Ergebnis nach einer Ernstschen KES-Färbung erscheint daher in oberirdischem Gewebe ein dichter Knäuel nicht auszählbarer Chromosomen. Gute Erfolge dagegen stellten sich ein nach einer Vorbehandlung mit Oxychinolin nach ERIO (1950). Die Gewebsstücke wurden etwa 3 Std in die Tjiosche Lösung gelegt und danach in dem Ernstschen Fixierungsfärbegemisch wie üblich fixiert und gefärbt. Sorgfältig mußten vor der Überführung in das Ernstsche Gemisch alle Reste von Wasser bzw. Tjio-Lösung durch Abtupfen auf Fließpapier entfernt werden. Selbstverständlich eignen sich so vorbehandelte Objekte wegen der c-mitotischen Wirkung des Oxychinolins nicht mehr zur Beobachtung von Spindel- oder Chromosomenanomalien.

D. Experimenteller Teil

I. Der Phänotyp

F₁. OEHLER hat im Jahre 1933 Untersuchungen über den Erbgang taxonomischer Merkmale bei Aegilops-Weizen-Bastarden unternommen und ist dabei zu dem Ergebnis gelangt, daß die meisten Aegilops-Merkmale dominant über Weizenmerkmale sind, einige Merkmale sich intermediär verhalten und daß nur sehr wenige Weizenmerkmale über Aegilops-Merkmale dominieren. Von dem Aegilops triuncialis × Tr. aestivum-F₁-Bastard bildet er auf S. 125, Fig. 11b eine Ähre ab. Diese Abbildung wie auch die Beschreibung im Text stimmt gut mit den in dieser Arbeit untersuchten F₁-Bastarden überein.



Abb. 1. Pflanze Nr. P I₃/55. F₂'-Bastard.
Öhrchenmosaik. 1:6



Abb. 2. Pflanze Nr. P I₃/55. F₂'-Bastard.
Blattlängenmosaik. 1:1/3

F₂'. Mit der Oehlerschen Beschreibung der Phänotypen der F₂' stimmten die spontanen F₂'-Bastarde aus dem Iran jedoch nicht überein. Schon frühzeitig ergab sich aus Schwierigkeiten bei der Bonitur die Vermutung, daß die F₂'-Pflanzen ein *phänotypisches Mosaik* zwischen Aegilops- und Weizenmerkmalen aufweisen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde das Merkmal „Öhrchen“ über einen längeren Zeitraum hinweg an allen sechs Pflanzen bonitiert. Das „Öhrchen“-Merkmal wurde als besonders geeignet für die Bonitur empfunden, weil es so gut wie keine Variationsbreite aufweist, wenn man ausgewachsene Blätter in gleicher Knotenhöhe miteinander vergleicht. Das Aegilops-Öhrchen ist kurz, breit und gewellt. Da die Scheiden auch am alten Blatt noch stengelumfassend sind, treten die Öhrchen, von der Vorderseite des Blattes aus betrachtet, übereinander. Die iranische Originalherkunft des Vaterweizens der untersuchten Bastarde hatte lange, nach vorn spitz zulaufende Öhrchen, die, da die Scheide des alten Blattes den Stengel nicht mehr ganz umfaßt, auch nicht übereinandertraten. Das ältere Aegilopsblatt klappt, wenn es ausgewachsen ist, infolge der eigenen Schwere am oberen Rande des Öhrchens nach unten und bildet dann mit dem Halm einen rechten bis stumpfen Winkel, während das Weizenblatt nicht am Öhrchen abknickt und mit dem Halm einen spitzen Winkel bildet. Sämtliche F₂'-Pflanzen zeigten nun Aegilops-Öhrchen und Weizenöhrchen an ein und derselben Pflanze. In Abb. 1 sind zwei solche Öhrchen der F₂'-Pflanze Nr. P I₃ abgebildet. Die Blätter waren etwa im gleichen Alter und befanden sich in gleicher Knotenhöhe am Sproß. Der linke Halm zeigt das Aegilops-, der rechte Halm das Weizenöhrchen mit der dazugehörigen typischen Blattstellung. Es wurden in nicht zu seltenen Fällen auch Öhrchen gefunden, die an der einen Hälfte der Scheide aegilops-ähnlich, an der anderen Hälfte weizenähnlich ausgebildet

waren. Das Blatt war dann, da es auf der Aegilopsseite zum Herunterklappen neigte, während die Weizenseite nicht nachgab, aus seiner symmetrischen Stellung zum Sproß gedrängt. Für andere taxonomische Merkmale wie: geknickter Halm am Grund bzw. aufrechter Wuchs, Schoßhöhe, Bewimperung bzw. Behaarung der Öhrchen, Blattlänge usw. glaube ich solche Merkmalsmosaiks auch beobachtet zu haben. Jedoch handelt es sich bei diesen um quantitative Merkmale mit großer Variationsbreite, die nach statistischen Methoden hätten bonitiert werden müssen, um zu unangreifbaren Ergebnissen zu kommen. Das lag außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. In den *Extremwerten* jedenfalls waren die Unterschiede auch ohne quantitative Analyse eindeutig zu erkennen. Abb. 2 zeigt ein Blattlängenmosaik. Das kurze Blatt hat die Blattlänge des Aegilops-Elters und ist in dieser Größenordnung beim Weizenelter nicht zu beobachten. Die beiden längeren Blätter gehören zum Weizenelter und liegen ebenfalls weit außerhalb der Variationsbreite der Aegilops-Blattlänge. Es handelt sich in beiden Fällen jeweils um das dritte Blatt von unten, die Blätter waren ausgewachsen.

II. Cytologische Untersuchungen

a) **Chromosomenzahlen.** Der cytologischen Untersuchung der spontan entstandenen im Iran gesammelten F_1 - und F_2' -Bastarde lag zunächst keine andere Absicht zugrunde, als durch Auszählen der Chromosomen die Bastardnatur der aufgefundenen Pflanzen zu bestätigen. Für die F_1 ließ sich eine Chromosomenzahl von 35 erwarten (*Aegilops triuncialis* $n = 14$ und *Triticum aestivum* $n = 21$).

Tabelle 1. *Chromosomenzahlen in Keimwurzeln experimenteller F_1 -Bastarde zwischen *Aegilops triuncialis* $\times$ *Triticum aestivum**

Eltern	
Koll.-Nr. 260b $\times$ 260a	1. Wurzelspitze 35—40; 42; 16; 30. Es werden auch kleinkernige Zellen beobachtet, die aber nicht ausgezählt werden können
260b $\times$ Heine V	1. Wurzelspitze 52; <35; 38; 47; 48 2. Wurzelspitze 35; 37; 37 ± 1 ; 35
2259/1956 $\times$ Heine V	1. Wurzelspitze 35; 35; 39; 27; 41—42 2. Wurzelspitze 35 ± 1 3. Wurzelspitze 41; um 40; um 32; 30 4. Wurzelspitze 39; 26; 23; 35; 29; 35; 28; 18; 10; $33 \pm$; 30 5. Wurzelspitze 49
Aeg. triuncialis unbek. Koll.-Nr. $\times$ Heine V	1. Wurzelspitze 43—45; 38—39; $52 \pm$; 35 genau; 34—35; 55 (Fragmentationen ?); 35; 35 2. Wurzelspitze 34—35; 35; 42 (Fragmente); 37 3. Wurzelspitze 35; 35; 31; 25 4. Wurzelspitze 35; mindestens 40; 30; 19, davon einige sehr kurze Bruchstücke; 46 ohne Fragmente; 41—42

Für die Chromosomenzahl der F_2' ließ sich eine solche Erwartung nicht aussprechen, da die Chromosomenzahlen wohl für die männlichen Gameten aber nicht für die weiblichen bekannt waren. Auf jeden Fall wäre aber sowohl in der F_1 wie in der F_2' nach allem, was bis jetzt in der Literatur über diese Bastarde bekannt ist, eine für jedes Individuum *konstante* Chromosomenzahl zu erwarten gewesen.

Die Untersuchungsbefunde stimmten mit den Erwartungen nicht überein.

In Tabelle 1 sind die Chromosomenzahlen zusammengestellt, die in Keimwurzeln experimenteller F_1 -Bastarde gefunden worden waren. Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß die erwartete Chromosomenzahl 35 zwar noch gezählt werden konnte, daß aber häufig auch Chromosomenzahlen in jeder beliebigen Größen-

ordnung gefunden wurden. Bei der vierten untersuchten Wurzelspitze der Kreuzung *Aegilops triuncialis* [2259 (1956)] $\times$ *Triticum aestivum* (Heine V) (Tabelle 1) trat unter 12 ausgezählten Zellen die Zahl 35 nur zweimal auf, die anderen 10 Zellen wichen von der erwarteten Chromosomenzahl ab. Als höchste Chromosomenzahl wurden in diesen Keimwurzeln 55 gezählt, als niedrigste 10.

Tabelle 2 bringt Chromosomenzahlen in Wurzelspitzen eines spontanen F_1 -Bastards, der sich bereits in blühhfähigem Alter befunden hat. Auch hier sind die Chromosomenzahlen variabel und schwanken zwischen 3 Chromosomen im kleinsten Kern und 53 Chromosomen im größten Kern.

Tabelle 2. *Chromosomenzahlen in Wurzelspitzen eines spontanen F_1 -Bastards, Juni 1955*

Pflanze Nr.	1. Wurzelspitze	2. Wurzelspitze	3. Wurzelspitze	4. Wurzelspitze
3481/5	9, 29+1, 28, 33+, 38, 30, 37, 8, 3	30	18, 41±	29, 31
	5. Wurzelspitze	6. Wurzelspitze	7. Wurzelspitze	8. Wurzelspitze
	7, 35, 9	41±1, 21, 53±, 35, 41±	25+2 bis 3	24
	9. Wurzelspitze	10. Wurzelspitze	11. Wurzelspitze	
	32±, 13+1	3, 19	35, 34+, 35+, 31, 30, 29, 33, 26 (Fragmente)	

Die älteren Cytologen suchten Kernteilungspathologien bei Bastarden ausschließlich im generativen Gewebe, befangen in der Vorstellung, daß im Soma keine Störungen zu erwarten seien, da sich ja hier die Chromosomen nur längsspalten und weder euploide Zahlenverhältnisse noch Homologie für einen ungestörten Ablauf der Mitose voraussetzen sind. Seitdem hat jedoch die cytologische Forschung längst die Einsicht gebracht, daß Störungen des Kernzyklus irgendwelcher Art im vegetativen Gewebe genauso ihren Ausdruck finden können, wie es vom generativen Gewebe seit langem bekannt war. So mehren sich in letzter Zeit die Arbeiten, die über intravariablen Chromosomenzahlen gerade im vegetativen Gewebe berichten (Literaturzusammenstellung hierüber bei PFITZER 1957). Oft wird die Häufigkeit einzelner Chromosomenzahlen statistisch ausgewertet und in graphische Darstellungen gebracht, um aus den Maxima für bestimmte Zahlen eventuell Rückschlüsse auf die Ursachen ziehen zu können.

Für die eigenen Befunde erschien eine Auswertung auf diese Weise unsinnig. Im Zusammenhang mit später noch zu erörternden Störungen des Kernzyklus betrachtet, muß angenommen werden, daß Kerne trotz gleicher Chromosomenzahlen aus den verschiedensten Chromosomenelementen zusammengesetzt sein können, d. h. *inkomparable Größen* in biologischer Hinsicht darstellen. Im Falle der vorliegenden F_1 -Bastarde sind lediglich Zellen untereinander vergleichbar, die die Ausgangschromosomenzahl der Zygote $2n = 35$ aufweisen. Von dieser Zahl kann angenommen werden, daß sie primär durch Kombination der männlichen und der weiblichen Gameten entstanden ist. Sie haben also in bezug auf eine normale Verteilung der Chromatiden in der Anaphase noch keine Störung erlitten.

Als zweite Gruppe von Kernen lassen sich solche mit einer Chromosomenzahl auffassen, die von 35 abweicht, d. h. gestörte Kerne, wobei natürlich die Ursachen für die Störungen recht heterogener Natur sein können. Aus Tabelle 1 läßt sich ein Anteil von 61% gestörten Kernen und 39% ungestörten Kernen für Keimwurzeln von F_1 -Bastarden errechnen, aus Tabelle 2 75% gestörte und 25% ungestörte Kerne für Wurzelspitzen blühhfähiger Pflanzen. Nicht alle Kernteilungspathologien werden sich auf die Chromosomenzahl auswirken. So

wird der Anteil gestörter Zellen wahrscheinlich noch etwas höher sein, als er sich in pathologischen Chromosomenzahlen zu erkennen gibt. Erstaunlicherweise ist er sehr hoch. Etwa $\frac{2}{3}$ der Zellen können intravariabel Chromosomenzahlen aufweisen, ohne Letalwirkung auf den Organismus.

Chromosomenzählungen in hochchromosomigen Zellen sind mit einem größeren Unsicherheitsfaktor belastet als in niedrigchromosomigen. Je mehr Chromosomen ein Kern enthält, desto seltener werden alle freiliegend angetroffen werden. Um die Zahl der auszählbaren Kerne in einem Präparat nicht allzu stark zu reduzieren, wurden auch Kerne gewertet, deren Chromosomenzahlen nur mit einer Genauigkeit von ± 2 bestimmt werden konnten. Daher sind in der Gruppe „ungestörte Chromosomenzahlen“ Kerne von 35–37 Chromosomen zusammengefaßt. Die errechneten Prozentzahlen sind also nur Annäherungswerte.

Tabelle 3 bringt Chromosomenzahlen in Wurzelspitzen der F'_2 -Pflanzen. Die Untersuchungen konnten hier über einen längeren Zeitraum ausgedehnt werden, da die Pflanzen sich nach Verklonung überwintern ließen. Sie wurden zu drei verschiedenen Terminen untersucht. April 1955: die Pflanzen hatten hier etwa das Alter, wo das 2. Laubblatt geschoben wird; Sommer 1955: in blühfähigem Alter; März 1956: überwinterte Klonteile, die gerade anfangen zum 2. Mal Ähren, zu schieben. Eine quantitative Auswertung wie bei der F_1 läßt sich für die F'_2 nicht geben, da die Chromosomenzahl der weiblichen F_1 -Gameten und damit auch die Ausgangschromosomenzahl der Zygote unbekannt war. Jedoch läßt sich nach dieser Tabelle sagen, daß die grundsätzlichen Befunde in der F'_2 dieselben sind wie für die F_1 : nämlich, daß das Wurzelspitzen Gewebe aus einem Mosaik von Kernen variabler Chromosomenzahlen besteht, das schon in Keimwurzeln und noch nach einem ganzen Jahr vegetativer Entwicklung festgestellt werden konnte.

Tabelle 3. Chromosomenzahlen in Wurzelspitzen; spontane F'_2

Pflanze Nr.	April 1955	Sommer 1955	März 1956
III ₁	23, 5, 21, 13	35 $\pm$, 50 $\pm$, 45 $\pm$, 42, 21, 48, 20, 46, 48, 6, 3	46, 37, 15, 47, 44, 45, 37, 38
I ₃	38 $\pm$, 48 $\pm$, 41 $\pm$, 49, 43 $\pm$, 7, 50 $\pm$	44 $\pm$, 46 $\pm$, 42, 39, 49, 59, 5, 24, 44, 44, 50	50, 10, 35, 26, 8
I ₂	32 und mehrere	55 $\pm$, 69, 70 $\pm$	
III ₂		49, 47, 20, 24, 36, 49, 39, 44, 4, 9, 22, 4, 47, 47	
II ₂		49	
II ₁		44, 52, 39, 21, 45, 50, 66, 30, 60, 60, 46, 51, 44, 47, 52, 21, 27	45, 42, 7 + 6 Bruch- stücke, 46, 19

Die Feststellung aberranter Chromosomenzahlen ausschließlich an Wurzelspitzen Gewebe würde nur sehr eingeschränkte Rückschlüsse erlauben. Wurzelspitzen Gewebe scheint eine besondere Labilität in bezug auf Störungen im Kernzyklus zu haben, wie nach Routineuntersuchungen an Wurzelspitzen Gewebe der verschiedensten Objekte im hiesigen Institut bekannt ist. Zwar war bei der cytologischen Durcharbeitung eines Getreidesortimentes die Erfahrung gemacht worden, daß gerade Gramineen unter normalen Verhältnissen sehr konstante, artspezifische Chromosomenzahlen auch in Wurzelspitzen aufweisen. Doch wurden zur Sicherheit auch noch Wurzelspitzen der Eltern der spontanen Bastarde wie auch anderer Herkünfte von *Tr. aestivum* und *Aeg. triuncialis* auf die Chromosomenzahlen hin untersucht.

Die Zählungen an mehreren Wurzelspitzen von acht verschiedenen Pflanzen von *Aeg. triuncialis* ergaben stets 28 ± 1 Chromosomen an ebensoviel *Tr. aestivum*-Pflanzen 42 ± 2 Chromosomen, wobei die Schwankung von ± 1 bzw. ± 2 Chromosomen als Untersuchungsfehler gelten muß. Der Unterschied zum Erscheinungsbild des Bastardgewebes fiel so stark ins Auge, daß eine genauere statistische Analyse unnötigen Aufwand bedeutet hätte.

Tabelle 4. *Chromosomenzahlen in oberirdischem, somatischem Gewebe (Spelzenbasen, junge Antheren usw.); spontane F₂, Mai 1956*

Pflanze Nr.	Chromosomenzahlen
III ₁	27, 25, 45 $\pm$, 20, 44 $\pm$, 25, 11, 29 $\pm$, 8, 32
I ₃	1. Präparat: 11, um 42, um 42, um 34, 9, einige sehr hochchromosomige Zellen 2. Präparat: 8, 10, um 42, nicht auszählbare hochchromosomige Zellen in großer Menge 3. Präparat: 30, 33, 17, 29, 45 $\pm$, 40 $\pm$, hochchromosomige Zellen um 60 in großer Menge 4. Präparat: 9, 34, 21, 39, 46 $\pm$, 29 $\pm$ 5. Präparat: 41, 52, 9, 46 6. Präparat: 49, 48, 46, 46, 49, 42, einige niedrigchromosomige Zellen
II ₁	um 50, 53, 3, 63, 27

Tabelle 5. *Chromosomenzahlen und Paarungsverhältnisse während der Diakinese in Pollenmutterzellen der F₂, Sommer 1956*

Pfl.-Nr. I ₃ F ₂	Paarung	1. 5 _{II} 10	2. 10 _{II} +1 _I 21	3. 14 _{II} +15 _I 43	4. 1 _{IV} +7 _{II} +24 _I 42
	Gesamtzahl				
	Paarung	5. 2 _{II} +18 _I	6. 12 _{II} +7 _I	7. 8 _{II} +1 _{II} inh. +1 _{IV} Transl. +7-8 _I	8. 8 _I
	Gesamtzahl	22	31	29-30	8
Pfl.-Nr. III ₁	Paarung	9. 12 _{II} +8 _I	10. 10 _{II} +10 _I 30		
	Gesamtzahl	32			
	Paarung	1. 5 _{II} +26 _I	2. 7 _{II} +25 _I	3. 9 _{II} +3 _I + einige nicht zählbare	4. 6 _{II} +21 _I
	Gesamtzahl	36	39	21+ einige	33
	Paarung	5. 3 _I 3	6. 7 _I 7	7. 7 _{II} +29 _I 43	8. 1 _{II} +11 _I 13
	Gesamtzahl				
	Paarung	9. 8 _{II} +21 _I	10. 9 _{II} +15 _I 33		
	Gesamtzahl	37			

Untersuchungen an oberirdischem Gewebe sollten den Nachweis erbringen, ob das Kernmosaik ausschließlich auf Wurzelspitzen beschränkt ist oder ob die ganze Pflanze von den Störungen erfaßt ist. Tabelle 4 bringt die Chromosomenzahlen, die in oberirdischem somatischem Gewebe (Spelzenbasen, jungen Antheren usw.) von spontanen F₂-Pflanzen gefunden wurden. Die Untersuchungen haben bestätigt — wenn auch nur stichprobenartig für einige F₂-Pflanzen —, daß auch das oberirdische Gewebe der untersuchten Bastarde intravariablen Chromosomenzahlen aufweist, die zwischen ähnlichen Extremen (Pflanze II₁ 3—63) schwanken können, wie in den Wurzelspitzen. Abb. 3 stammt aus dem vegetativen Gewebe

einer jungen Anthere einer F_2' -Pflanze. Sie zeigt zwei Metaphaseplatten in nur wenig gestörtem Gewebsverband. Die Chromosomen sind nicht auszählbar, worauf in diesem Falle auch verzichtet werden konnte, da der Kerngrößenunterschied von etwa 1:3 ohne weiteres ins Auge fällt. Waren die Kerngrößenunterschiede extrem, so konnten sie auch schon an Ruhekernen und in frühen Teilungsstadien erkannt werden. — In allen anderen Stadien wie Anaphase und Telophase konnten Kernmosaiks auch beobachtet werden, aber selbstverständlich können in diesen Stadien auch immer nur extreme Unterschiede

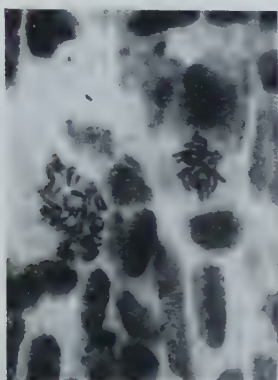


Abb. 3. Pflanze Nr. P I₃/55. F_2' . Somatisches Gewebe aus junger Anthere. Zwei Metaphasen, der größere Kern enthält etwa dreimal soviel Chromosomen wie der kleinere. Vorbehandelt nach Tjvo, gefärbt nach ERNST. Etwa 700 ×

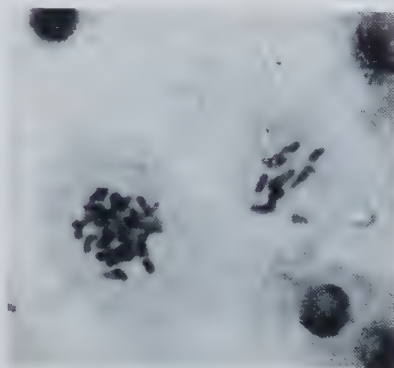


Abb. 4. Pflanze Nr. P I₃/55. F_2' . Zwei Pollenmutterzellen aus derselben Anthere, die kleine mit $8I + 1II$, die größere nicht auszählbar. 600 ×

erfaßt werden, während die feineren Zahlenunterschiede nur einer Analyse in der Metaphase zugänglich sind.

Die Untersuchung von Pollenmutterzellen gestaltete sich aus Materialgründen außerordentlich schwierig. So wurden genauere Chromosomenzählungen mit Berücksichtigung der Bivalentenpaarung nur an zwei F_2' -Pflanzen vorgenommen. Beide Pflanzen zeigen auch in den Pollenmutterzellen intravariablen Chromosomenzahlen. Bei den Pollenmutterzellen der Pflanze I₃ bewegen sich diese Zahlen zwischen den extremen Werten 8 und 43, bei der Pflanze III₁ zwischen 3 und 43. Die Bivalente streuen zwischen 0 und 14 bei der Pflanze I₃ und 0 und 9 bei der Pflanze III₁, wobei selbst Zellen mit annähernd gleichen Chromosomenzahlen große Unterschiede in der Bivalentenpaarung aufweisen können. Die Zelle 1 der Pflanze I₃ weist 10 Chromosomen in 5 Bivalenten auf, die Zelle 8 8 Chromosomen, die ungepaart vorlagen. Abb. 4 zeigt zwei Pollenmutterzellen aus einer Anthere der Pflanze PI₃, die kleinere davon mit $8I + 1II = 10$ Chromosomen, die größere wegen Schrumpfung des Kerns nicht auszählbar, aber deutlich wesentlich mehr Chromosomen enthaltend als die kleinere. Für die F_1 konnte das Kernmosaik in den Pollenmutterzellen in Übersichtsbildern auch festgestellt werden, doch waren hier genauere Zählungen wegen der noch unübersichtlicheren Paarungsverhältnisse nicht möglich.

b) **Multipolare Spindeln.** In den Pollenmutterzellen von *Aegilops*-Weizen-Bastarden der verschiedensten Kombinationen sind tri- bis tetraploide Spindeln schon von den ältesten

Autoren, die sich mit der Cytologie dieser Objekte befaßt haben, beobachtet worden (BALLY 1919). In mehreren folgenden Arbeiten konnte dieser Befund bestätigt und ausgebaut werden (z. B. BLEIER 1930, PERCIVAL 1930). Zwar ist er von MATSUMOTO (1933), der das Vorkommen tri- bzw. tetrapolarer Spindeln in Pollenmutterzellen mit der genomanalytischen Methode für unvereinbar hielt, angezweifelt worden. Die tetraploiden Spindeln BLEIERS möchte er als Teilungsfiguren zweikerniger Zellen, tripolare Spindeln als extrem lange, aus Raum-mangel in der Zelle verbogene zweipolige Spindeln gedeutet wissen. Bestimmt gibt es Konfigurationen, die nur im Sinne MATSUMOTOS gedeutet werden können. BLEIER selbst bringt in Abb. 30 eine solche „besonders lange Spindel“.

Ebenso sicher aber wurden von BALLY, BLEIER, PERCIVAL und mir selbst Konfigurationen beobachtet, die nur als drei- bzw. vierpolige Spindeln gedeutet

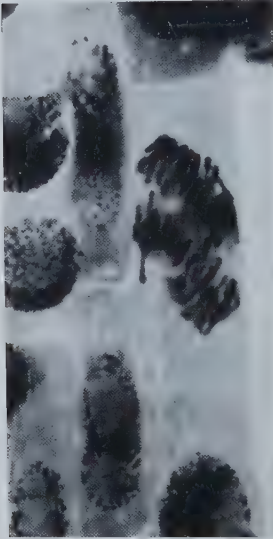


Abb. 5. Experimenteller F_1 -Bastard zwischen *Aegilops triuncialis* $\times$ *Triticum aestivum*. Tetrapolare Spindel aus Keimwurzel. 1200 $\times$

werden können. (Hierzu eigene Abb. 13 und deren Beschreibung unter dem Abschnitt „Fragmentationen“.) Schon hier soll auf die wichtige Tatsache hingewiesen werden, daß in *Pollenmutterzellen* weder von BLEIER und PERCIVAL noch von mir selbst *jemals mehr als vier Pole* beobachtet werden konnten.

Größtes Interesse verdient das Vorkommen multipolarer Spindeln in *somatischem Gewebe* — sowohl in Wurzelspitzen wie in oberirdischen Pflanzenteilen — bei F_1 -Bastarden wie bei F_2 -Bastarden und die ganz spezifische Art ihrer Ausbildung. Abb. 5 zeigt eine tetrapolare Spindel aus der Wurzelspitze eines experimentellen F_1 -Bastards. Optisch untere und optisch obere Zellwandgrenzen sind zu erkennen, so daß noch ein gewisser räumlicher Eindruck vorhanden ist, der im allgemeinen in stärker gequetschten Präparaten wie in Abb. 6 verlorengeht. Neben tetra- und tripolaren Spindeln, die von Pollenmutterzellen her schon bekannt waren, können aber auch solche Kon-

figurationen wie Abb. 7 beobachtet werden. Die Spindel — es handelt sich um eine sehr späte, daher schon stark kontrahierte Telophase — weist auch hier vier Pole auf, von denen aber drei in die gleiche Richtung ziehen und nur einer in die andere. Die Spindel ist *multiheteropolar*. Im ganzen konnten bis zu fünf Pole beobachtet werden, die in einem Falle 4:1, in einem anderen 2:3 gegenüberlagen.

Multipolarität gibt sich nicht nur in der Anaphase zu erkennen, wo sie an der Spindel direkt beobachtet werden kann, sondern müßte sich auch auf alle folgenden Stadien auswirken, in denen die Spindel aufgelöst ist. So begegnet man solchen Telophasekonfigurationen, wie in Abb. 8 dargestellt. Diese Abbildung zeigt einen Telophasekern, von dem nur ein Pol scharf abgebildet ist, der zweite liegt unter der Bildebene und erscheint deshalb unscharf. Am scharf abgebildeten Pol sind die Chromosomen in zwei Gruppen geteilt, eine größere und eine kleinere. Die größere Gruppe ist fast genau in Polansicht zu sehen und zeigt die Chromosomen im Kreis angeordnet. Die Zentromere deuten auf den

Mittelpunkt dieses Kreises, den einen Spindelpol. Die kleinere Gruppe ist einem eigenen Pol gefolgt, wenn sie auch die typische Anordnung der Chromosomen im Kreis um den Pol wie in der größeren Gruppe des Präparates nicht erkennen läßt, da sie nicht genau in Polansicht getroffen ist. Der einer solchen Telophase folgende Ruhekern müßte in seiner Form die Herkunft von einer zweipoligen Telophase noch erkennen lassen. Tatsächlich können langgestreckte Ruhekern mit einer hantelförmigen Einschnürung auch gefunden werden. Jedoch sind solche Ruhekern auch nach anderen Zyklusstörungen, z. B. Endomitosen im weiteren Sinne, Pseudoamitosen usw. zu erwarten.

Es ist bekannt, daß die Chromosomen die ihnen in der Telophase zugeordnete Lage im darauffolgenden Zyklus bis in die frühe Metaphase hinein beibehalten und daher zu erwarten, daß die Folgestadien eines durch eine multipolare Spindel geteilten Kerns die Herkunft von zwei

Abb. 6. Pflanze Nr. P III₁/55. F₂-Bastard. Tetrapolare Spindel aus Wurzelspitze. 720 ×

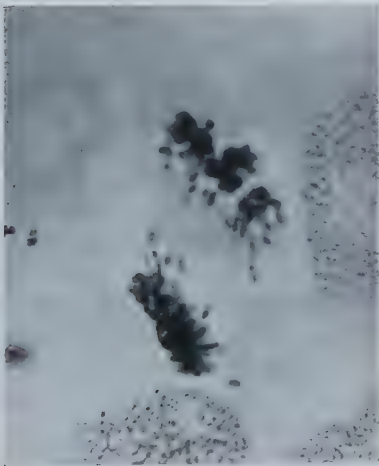


Abb. 7. Pflanze Nr. 55 3481 5. F₁-Bastard. Multi-heteropolare Spindel aus dem Soma einer jungen Anthere. 1200 ×

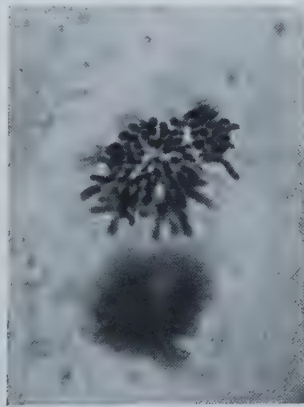
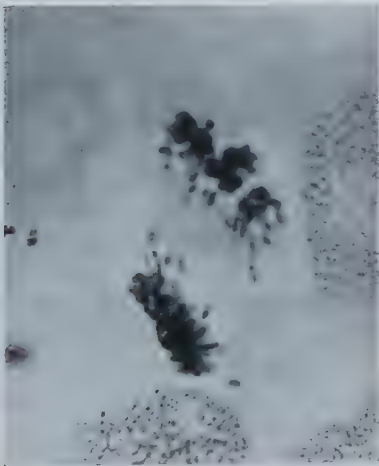


Abb. 8. Pflanze Nr. P II₁/55. F₂-Bastard. Wurzelspitze, Telophase. Der im Photo scharf abgebildete Tochterkern ist an zwei gleichsinnig gerichteten Polen entstanden. 1200 ×.
Siehe Text

oder mehreren Polen erkennen lassen. Die Zelle in Abb. 9 zeigt zwei Prophasekerne. Der obere — langgestreckte — in Polansicht getroffene, hat zwei Kreise von Chromosomen, die an ihrem Zentromer abgewinkelt sind und mit diesem auf den Mittelpunkt des Kreises weisen, der untere Kern annähernd rund, nur einen solchen Kreis. Wenn wir die Annahme machen, daß hier die Zellwandbildung ausgefallen ist, und diese Annahme ist berechtigt, da auch sonst häufig beobachtet wird, daß die Zellwandeinziehung zwischen zwei Tochterkernen unterbleiben kann, so erklären sich die zwei Kerne dieser Zelle zwanglos als Tochterkerne eines durch eine tripolare Spindel geteilten Mutterkerns.

In der Metaphase konnten ebenfalls in Gruppen zerfallene Kerne beobachtet werden, doch ist hier Herkunft und Ursache solcher Kerne nicht so einfach durchschaubar. Es läßt sich häufig nicht entscheiden, ob die Gruppen aus *einem* Kern hervorgegangen sind oder ob sie aus *mehreren* (Mikro-)Kernen stammen.



Abb. 9. Pflanze Nr. P III₃/55. F₂. Zweikernige Zelle in der Prophase. Der obere Kern besteht aus zwei Gruppen. Die Konfiguration geht zurück auf eine Kernteilung durch eine dreipolige Spindel, bei der die Zellwandeinziehung zwischen den Tochterkernen ausgefallen ist. Etwa 1000 ×. Siehe Text

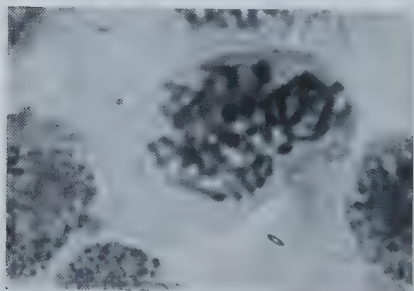


Abb. 10. Pflanze Nr. 55 3481/5. F₁. Soma aus junger Anthere. In drei Gruppen zerfallene Metaphase. 1200 ×. Siehe Text

Im ersteren Falle möchte ich — wenigstens bei den von mir untersuchten Objekten — annehmen, daß sie als unmittelbare Folge — zeitlich und kausal — einer multipolaren Spindel zu deuten sind, während im zweiten auch andere Ursachen (Verklebungen, Fragmentationen, liegengebliebene Chromosomen des vorausgegangenen Zyklus, die eigene Kerne gebildet haben) für die metaphasische Gruppenbildung eine Rolle spielen können. Abb. 10 bringt eine somatische Metaphase aus einer jungen Anthere eines F₁-Bastards. Es sind drei Metaphaseplatten gebildet statt einer, die sich alle drei in Äquatoransicht darbieten. Die Chromosomen hängen infolge ihrer Länge mit den Enden aus den Äquatorplatten heraus. Die Zelle ist nur wenig gequetscht, um die ursprüngliche Lage der Chromosomen nicht zu verändern. Der allgemeine Eindruck dieser Zelle (bis auf die Gruppenbildung wenig gestört) geht dahin, daß diese Metaphasegruppen die unmittelbare Folge einer mehrpoligen Spindel sind, bei der drei Pole in die gleiche Richtung zogen.

Doch sind häufig auch Bilder beobachtet worden, die den Schluß erlaubten, daß die Metaphasegruppen aus mehreren verschiedenen Kernen hervorgingen.

Dagegen läßt sich die beobachtete metaphasische Gruppenbildung nicht in Vorgänge einordnen, die HUSKINS und seine Schüler unter dem Begriff der „somatischen Reduktion“ beschreiben¹.

e) **Fragmentationen und Chromosomenumbauten.** Sowohl in der F₁ als auch in der F₂ konnten häufig meiotische Paarungskonfigurationen beobachtet werden, die den Rückschluß auf komplizierte mehrfache Fragmentationen und Chromosomenumbauten in prämeiotischen Mitosen erlaubten. Als ein willkürlich herausgegriffenes Beispiel sei die in Abb. 11 dargestellte Zelle diskutiert. Es ist die

¹ J. Hered. 40, 3; 41, 13; 42, 183.

Diakinese des F_2' -Bastardes Nr. P I₃, derselben Pflanze, von der auch Abb. 4 stammt. Eine Auszählung der Chromosomen ergibt 7—8 Univalente, 8 Bivalente, von denen angenommen werden kann, daß sie nicht fragmentiert und normal homolog gepaart sind, ein Bivalent, von dem ein Chromosom deutlich kürzer ist als das andere, also einen Stückverlust erlitten haben muß, und einen Viereitranslokations-Kreuzpaarungsverband, dessen Paarung aus unbekannten, vielleicht rein mechanischen Gründen nicht vollkommen geschlossen ist.

In somatischen Zellen lassen sich Chromosomenbrüche und Umbauten nur dann eindeutig erkennen, wenn azentrische Chromosomenstücke beobachtet werden, die in der Anaphase nicht mittransportiert werden, oder wenn eine morphologische Veränderung der in nichtfragmentiertem Zustand morphologisch gut bekannten Chromosomen festgestellt werden kann. Für die Eltern der untersuchten Bastarde ist eine derartig genaue Kenntnis der Chromosomenmorphologie noch nicht erarbeitet worden. Nur soviel ist bekannt, daß beide Eltern — sowohl *Aegilops triuncialis* wie auch *Triticum aestivum* — Chromosomen von beachtlicher Länge aufweisen. Trifft man Metaphaseplatten, wo auffallend viele punktförmige Chromosomeneinheiten zu sehen sind, und solche Bilder sind häufig zu beobachten, kann wohl mit Sicherheit angenommen werden, daß diese durch Fragmentationen entstanden sind.

Als mögliche Ursachen für das Auftreten von Brüchen in somatischen Zellen nennt MARQUARDT (1950) Verklebungen von Chromosomenoberflächen oder Chromatiden und „lokale Achromasien“. Beide Erscheinungen können beobachtet werden. Abb. 12 zeigt eine somatische Metaphase eines F_1 -Bastards, in der fast jedes einzelne Chromosom ungefärbte mit DNS unterbeladene „Querbanden“ zeigt, Lockerstellen, die im Verlauf des weiteren Kernzyklus zum mehr oder minder „totalen Zusammenbruch“ des Chromosomengefüges führen können. Solche Konfigurationen werden nur in somatischem Gewebe beobachtet. Verklebungen dagegen fielen nur in Pollenmutterzellen auf. Möglicherweise sind sie in somatischem Gewebe aber nur der Beobachtung entgangen. Abb. 13 bringt eine solche Pollenmutterzelle mit Verklebungen von Chromosomen eines F_1 -Bastards.



Abb. 11. Pflanze Nr. P I₃/55. F_2' . Pollenmutterzelle. Diakinese. 8II + 1II inhomolog + 1IV Translokationspaarungsverband + 7—8I = 29—30 Chromosomen. 1200 ×

Dieses Bild zu kommentieren ist außerordentlich schwierig, weil es so gut wie jede Analogie zu normalen Konfigurationen vermissen läßt. Eine Plasmaausstrukturierung in Winkelform läßt das Vorhandensein von zwei Spindeln mit drei Polen vermuten, von denen ein Pol den beiden Spindeln gemeinsam ist. Die Spindeln stehen im rechten Winkel zueinander. In jeder Spindel liegen je zwei, im ganzen vier, nicht ausdifferenzierte Chromatinklumpen; sie müssen als miteinander verklebte Chromosomen aufgefaßt werden. Durch die in der Abbildung vertikal stehende Spindel zieht sich eine extrem gezerzte Chromosomenbrücke: das eine (obere) Ende des Chromosoms klebt an einem dieser Chromatin-

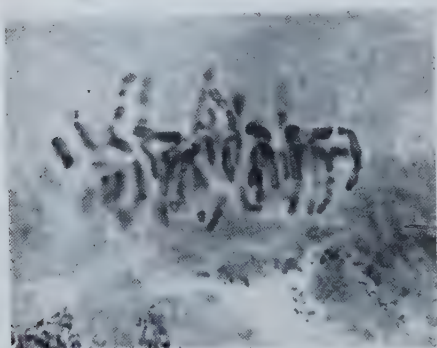


Abb. 12

Abb. 12. Pflanze Nr. 55/3481/5. F₁, Wurzelspitze. Chromosomen mit lokalen Achromasien. 1200 ×

Abb. 13. Pflanze Nr. 55/3481/5. F₁, Pollenmutterzelle. Tripolar. Weitere Einzelheiten im Text

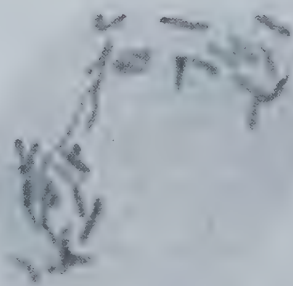


Abb. 13

klumpen, das andere Ende ist — vielleicht durch ein eigenes Kinetochor, vielleicht aber auch mit einem zweiten Klumpen verklebt — mit diesem auf den unteren Pol zu gezerzt worden. Wenig später hätte hier ein Bruch stattgefunden. In derselben — vertikalen — Spindel liegt eine zweite Brücke kreuzweise über der eben geschilderten. Das gezerzte Chromosom ist an seinem unteren Ende bereits aus der Verklebung gelöst oder gerissen. In der zweiten — horizontalen — Spindel liegt am rechten Pol ein weiterer solcher Klumpen miteinander verklebter Chromosomen. Zweifellos weist diese Zelle außer diesen Verklebungen und der Tripolarität noch weitere Störungen auf wie z. B. nicht angeheftete Chromosomen. Doch ist das pathologische Erscheinungsbild bereits so komplex, daß eine Analyse im einzelnen nicht mehr möglich sein dürfte.

E. Diskussion

Für das Studium von Pathologien im Kernzyklus sowohl der Mitose als auch der Meiose gibt es wesentlich günstigere Objekte als die pentaploiden Aegilops-Weizen-Bastarde, die infolge der hohen Chromosomenzahl, ihrer in beiden Eltern sehr langen Chromosomen und infolge fehlender Kenntnis der Chromosomenmorphologie jede Feinanalyse erschweren. Die Wahl des Objektes rechtfertigt sich allein durch die Bedeutung, die diese und ähnliche Bastarde bisher schon für die verschiedensten Zweige botanischer Forschung — Cytologie und Cyto-genetik, Phylogenie, Systematik, Pflanzenzüchtung und ähnliche — gehabt haben.

Bereits auf BALLY (1919) geht die Vorstellung zurück, daß väterliche und mütterliche Kernkomponenten ihre Individualität in Bastardkernen bewahrt haben und daß im Laufe der Meiosis Kerne zustande kommen können und auch in besondere Zellen verlagert werden können, die ausschließlich Chromatin des einen Elter enthalten (S. 204). BLEIER (1930) beobachtete in Pollenmutterzellen tri- und tetrapolare Spindeln (und zwar nie mehr als vier Pole), in anderen Fällen eine zeitliche Aussortierung der Chromosomen gleicher Kerne in zwei Portionen gegeneinander, von mir selbst wiederbeobachtet und in der Abb. 14 abgebildet. Da er glaubte, daß Doppelspindeln und zeitlich gegeneinander aussortierte Gruppen väterliche und mütterliche Genome reinlich voneinander trennen, begründete er mit diesen Beobachtungen seine *Kryptogonomerietheorie*, die besagt, „daß Genoplast und Paragenoplast (ein von ihm eingeführter, aber in der cytologischen Literatur nicht heimisch gewordener terminus technicus für den achromatischen Spindelapparat) ihre Individualität behalten haben und sich bei der Reduktionsteilung infolge Disharmonie voneinander trennen“ (S. 137).

Am intensivsten sind cytologische Untersuchungen an Bastarden zwischen *Aegilops* aller Arten und Weizen aller Arten wohl von der genomanalytischen japanischen Schule unter der Leitung von KIHARA durchgeführt worden mit der Absicht, die Verwandtschaftsbeziehungen im *Triticum-Aegilops*-Kreise aufzuklären. Die genomanalytische Methode hat schon bald nach ihrem Bekanntwerden eine heftige Diskussion hervorgerufen, die bis in die jüngsten Arbeiten fort dauert (BLEIER 1930, VON BERG 1932, LEVAN 1942, LOVE 1941, GAUL 1954). Inhomologe Paarung, Autosyndese, eine zu große Streuung in der Zahl der Bivalente innerhalb eines Bastards, sowie in jüngster Zeit auch genetisch bedingte Desynapse und Asynapse begründeten die Kritik. SEARS (1948) kommt deshalb zu dem Schluß, daß die genomanalytische Methode in vielen Fällen zwar die wahren Verhältnisse erfaßt und geeignet ist, erste Unterlagen für weitere Studien zu liefern, daß sie aber für andere Fälle eine zu große Vereinfachung bedeutet, um noch anwendbar zu sein.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben nun als neues und überraschendes Ergebnis, daß sowohl die F_1 als auch die F'_2 der *Aegilops triuncialis* $\times$ *Triticum aestivum*-Bastarde in Wurzelspitzen wie in oberirdischem, somatischem Gewebe vom Keimlingsalter an bis zur fruchtenden Pflanze sowie in Pollenmutterzellen ein Mosaik von Kernen der verschiedensten Chromosomenzahlen aufweist. Die älteren cytologischen Arbeiten waren noch in der Vorstellung von BLEIER (1930, S. 125) befangen, daß in somatischen Kernteilungen von Bastarden keine Störungen zu erwarten seien, da sich ja hier die Chromosomen längsspalten und weder Homologie noch Euploidie die Voraussetzung für einen ungestörten Ablauf der Mitose bilden. In der cytologischen Literatur der letzten Jahre dagegen erscheinen häufig Berichte über Kernmosaik an den verschiedensten Objekten und unter den verschiedensten Voraussetzungen. Eine Zusammenstellung und Besprechung der wichtigsten Literatur befindet sich bei PFITZER (1957). Zu ergänzen bliebe nur die Arbeit von BRABEC (1949). Er untersuchte an den Burdonen *Solanum nigrum-lycopersicum* Ausstriche von Antheren und Fruchtknoten und fand auch intraindividuelle variable Chromosomenzahlen in diesen. Die gefundenen Chromosomenzahlen ließen keinen gesetzmäßigen Zusammenhang etwa im Sinne eines Maximums für eine oder mehrere Zahlen erkennen. Es scheint mir in diesem Falle eine weitgehende Parallele zu den Befunden an

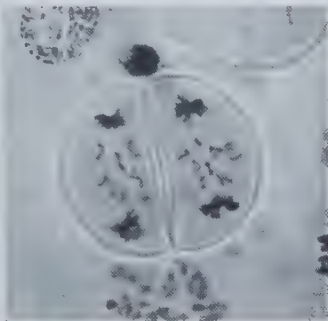


Abb. 14. Pflanze Nr. P II₂/55. F'_2 . Dyade. Telophase II. In der Mitte der Zelle je eine Gruppe verzögerter Chromosomen in der Metaphase II-Lage. 600 $\times$

den untersuchten *Aegilops triuncialis* $\times$ *Triticum aestivum*-Bastarden vorzuliegen, wo eine nicht gesetzmäßige Variabilität der Chromosomenzahlen in den untersuchten Gewebsteilen festgestellt wurde.

Bezüglich der *Ursachen*, die zu intravariablen Chromosomenzahlen führen können, bestehen bisher nur Vermutungen. Einige Autoren begnügen sich mit dem Befund und diskutieren die Ursachen nicht (LOVE 1938, THERMAN und TIMONEN 1951, BRABEC 1949, 1954). Andere Autoren finden Kernmosaik gekoppelt mit multipolaren Spindeln (VAARAMA 1949) oder glauben genkontrollierte Spindelstörungen annehmen zu können (SACHS 1952). In beiden Fällen werden die Spindelstörungen als unmittelbare Ursache für die Fehlverteilungen angesehen. Es ist auffällig, daß bei den eigenen Untersuchungen das Kernmosaik auch zusammen mit multipolaren Spindeln gefunden wurde und es läge nahe, diese beiden Erscheinungen ebenfalls kausal miteinander in Beziehung zu setzen. Jedoch erheben sich hier Bedenken. Multipolare Spindeln können nur dann zu intravariablen Chromosomenzahlen führen, wenn die an gleichsinnig gerichteten Polen befindlichen Chromosomenportionen nicht nur eigene Kerne mit abgeschlossener Kernmembran, sondern möglichst auch noch eine Zellwand dazwischen ausbilden. Nun sind zwar häufig doppelwertige Ruhe- und Prophasekerne beobachtet worden, von denen mit Sicherheit behauptet werden konnte, daß sie von zwei *gleichsinnig* gerichteten Polen gebildet werden (der obere Kern in Abb. 9). Es konnten auch Zellen mit zwei Kernen beobachtet werden, von denen ebenfalls mit Sicherheit gesagt werden konnte, daß die beiden Kerne von *gegenüberliegenden* Polen stammten und durch Ausfall der Zellwandbildung in das gleiche Zellumen zu liegen kamen. Der Fall ist jedoch nicht beobachtet worden, daß Chromosomenportionen an zwei gleichsinnig gerichteten Polen eigene Kerne ausbilden. Immerhin wäre er denkbar. Bestimmt wird er dann aber nicht mit einer Häufigkeit eintreten, die ausreichen würde, um *allein* das häufige Vorkommen intravariabler Chromosomenzahlen zu erklären. Gänzlich unvereinbar mit der Vorstellung von der Bildung des Phragmoplasten in der Äquatorplatte erscheint es mir, daß Kerne, die an zwei gleichsinnig gerichteten Polen entstehen, durch eine Zellwand voneinander getrennt werden könnten. So ist es im höchsten Grade unwahrscheinlich, daß multipolare Spindeln intraindividuelle Chromosomenzahlen bewirken können, wenn auch beide Erscheinungen manchmal am gleichen Objekt beobachtet werden.

Von größtem Effekt für die Bildung intravariabler Chromosomenzahlen müßten dagegen *Verklumpungen* von Chromosomen sein, wie sie in der Meiose wohl, dagegen nicht in mitotischen Stadien gefunden wurden. Solche Verklumpungen werden sich nicht nur auf die Chromosomenzahlen, sondern auch auf die Chromosomenkombinationen auswirken. Kerne mit gleicher (pathologischer) Chromosomenzahl brauchen und werden in den meisten Fällen nicht identisch sein.

C-Mitosen sind nicht beobachtet worden und können auch nicht allzu häufig vorgekommen sein, weil dann viel häufiger Kerne in euploiden Zahlenverhältnissen hätten beobachtet werden müssen. Dagegen ist es durchaus wahrscheinlich, daß außer Verklumpungen von Chromosomen, non-disjunction von Chromatiden sowie Elimination einzelner Chromosomen infolge versäumter Anheftung die normale Verteilung der Chromatiden auf die Tochterkerne gestört haben.

Der Weg vom Auffinden *multipolarer Spindeln* und der Beschreibung ihrer mannigfachen Erscheinungsformen bis zur Aufklärung der Ursachen ist weit und kann heute — 27 Jahre nachdem BLEIER die Kryptogonomerietheorie zu ihrer Erklärung aufgestellt hatte — immer noch nicht mit voller Sicherheit beschritten werden.

In tierischen und menschlichen Zellen werden multipolare Spindeln heute allgemein auf mangelhafte Synchronisation von Chromosomen- und „Spindelzyklus“ zurückgeführt (THERMAN und TIMONEN 1950). Bei höheren Pflanzen, wo über die Induktion der Spindel wesentlich weniger bekannt ist als bei tierischen Zellen, können ähnliche Vorgänge nur mit Vorbehalt angenommen werden. Immerhin würde die Hypothese mangelhafter Synchronisation von Chromosomen- und „Spindelzyklus“ als Ursache der multipolaren Spindeln die Deutung weiterer Eigenheiten ihrer Erscheinungsformen in den Bastarden erleichtern.

1. Multipolare Spindeln in *Pollenmutterzellen* erscheinen drei- oder vierpolig. Spindeln mit mehr als vier Polen sind bisher noch nicht beobachtet worden. Dreipolige Spindeln können in typischen Fällen, wenn sie in günstiger Ebene abgebildet sind, einen rechten Winkel miteinander bilden (Abb. 13). Pollenmutterzellen haben eben nach zwei Teilungen, die rasch aufeinanderfolgen, ihre Entwicklung zunächst abgeschlossen. Eine dritte Teilung, die postmeiotische Mitose, ist durch eine Pause von den ersten beiden getrennt. Daher die Tatsache, daß diese dritte Spindelgeneration in multipolaren Spindeln nicht mehr erscheint.

2. Die Spindeln der ersten und der zweiten Reifeteilung pflegen in normalen Meiosen im rechten Winkel zueinander zu liegen. Der optische Eindruck der Zelle in Abb. 13, wo beide Spindeln im rechten Winkel zueinander liegen, geht ganz dahin, als ob die eine Spindel noch die Reduktionsspindel sein könnte, während die andere bereits eine der beiden Äquationsspindeln darstellt.

3. In somatischen Zellen dagegen können auch mehr als vier Pole in einer Zelle beobachtet werden bzw. mehr als zwei gleichsinnige (Abb. 7). Eine somatische Zelle hat eben die Potenz zu mehr als zwei aufeinanderfolgenden Teilungen.

Ein Überblick über die in den untersuchten Objekten vorgefundenen Zellteilungsanomalien wie „lokale Achromasien“ (MARQUARDT 1950), Verklumpungen von Chromosomen und als deren Folge intravariablen Chromosomenzahlen und Brüche und Umbauten sowie multipolare Spindeln ergeben das zytologische Bild von stark stoffwechselgeschädigten Pflanzen wie es sich in den Untersuchungen von OEHLKERS und seinen Schülern, besonders WOLL (1953) und GLÄSS (1955, 1956), nach Einwirkung von Nukleinsäure und -derivaten sowie zellfremden Stoffwechselgiften darbot. Der Unterschied liegt lediglich darin, daß die in diesen Untersuchungen beobachteten Pathologien exogen induziert waren, während für die untersuchten Bastarde angenommen werden muß, daß die Stoffwechselschäden endogenen Ursprungs sind und ihre Ursachen wahrscheinlich in der genetischen Konstitution der Bastardzygote haben.

Die genomanalytische Methode wird den Verhältnissen in den untersuchten Bastarden nicht gerecht. Die Schwankung in der Anzahl der Bivalente erklärt sich nicht nur aus den bisher bekannten Gründen, sondern kann die Ursache auch in intravariablen Chromosomenzahlen haben sowie in der Tatsache, daß

in der F_1 durch prämeiotische Störungen *gleichelterliche* homologe Chromosomen in dieselbe Zelle geraten können. Es liegt hier offensichtlich eines jener Objekte vor, für die die Methode der Genomanalyse eine zu große Vereinfachung bedeutet (SEARS 1948).

Daß die Pathologien der Kernteilungen der untersuchten Bastarde mit dem verschwommenen Ausdruck von einer „Dualität der Bastardkerne“ belegt werden können, ist zweifellos richtig. Nur äußert sich diese Dualität nicht in einer quantitativ genauen Aussortierung von väterlichem und mütterlichem Genom wie es BLEIER vorschwebte, sondern allein in Kernpathologien, die vermutlich ihre Ursache in stoffwechselphysiologischer Disharmonie der Bastardzygote haben.

Eine Ausweitung der an dem *Aegilops triuncialis* × *Triticum aestivum* gemachten Befunde ist daher weder auf andere *Aegilops*-Weizenbastarde noch auf Gattungsbastarde ganz allgemein erlaubt. Es muß aber mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß sie auftreten *können* und daß infolgedessen die Bastardzytologie ein viel individuelleres Arbeiten erfordert als es bisher im allgemeinen der Fall war.

Zusammenfassung

1. Es wurden spontane und experimentelle *Aegilops triuncialis* × *Triticum aestivum*- F_1 -Bastarde und eine spontane F'_2 cytologisch untersucht.

2. Sämtliche untersuchten Bastarde wiesen in Wurzelspitzen, in oberirdischem, somatischem Gewebe, sowie in Pollenmutterzellen intravariabile Chromosomenzahlen auf.

3. Diesem Kernmosaik entsprach in der F'_2 ein phänotypisches Merkmalsmosaik zwischen *Aegilops*- und Weizenmerkmalen, in der F_1 jedoch nicht. Diese war phänotypisch einheitlich und entsprach der Beschreibung von OEHLER (1933, S. 125).

4. An sonstigen Kernteilungspathologien wurden beobachtet: in somatischem Gewebe lokale Achromasien, Fragmentationen, multipolare Spindeln, zwei- bis mehrkernige Zellen, Brückenbildungen und die sekundären Folgeerscheinungen dieser Pathologien, in Pollenmutterzellen Fragmentationen und Umbauten, tri- bis tetrapolare Spindeln, Verklebungen von Chromosomen.

5. In Pollenmutterzellen haben mehrpolige Spindeln drei oder vier (nicht mehr) Pole. In somatischem Gewebe können mehrpolige Spindeln auch mehr als vier Pole haben bzw. mehr als zwei Pole, die in die gleiche Richtung ziehen.

6. In Analogie zu den Verhältnissen in tierischen und menschlichen Zellen kann angenommen werden, daß die multipolaren Spindeln der untersuchten Bastarde durch Störung der Synchronisation von Chromosomenzyklus und „Spindelzyklus“ entstanden sind.

7. Die Tochterkerne eines durch eine multipolare Spindel geteilten Mutterkerns lassen ihre Herkunft von mehreren Polen in Telophase, Prophase und in einigen Fällen auch in der frühen Metaphase noch erkennen. Telophase, Prophase und frühe Metaphase zeigen dann zwei (oder mehrere) Kreise von Chromosomen, die am Zentromer abgewinkelt sind und mit diesem auf den Pol weisen, auf den zu sie bewegt worden sind. Doch werden in der Metaphase auch Gruppen beobachtet, die ihren Ursprung in mehreren Kernen gehabt haben müssen.

8. Pollenmutterzellen weisen in der F_1 und in der F'_2 eine große Streuung in der Bivalentenzahl auf. Die Ursache hierfür wird in erster Linie in den intra-variablen Chromosomenzahlen und den von Zelle zu Zelle wechselnden Chromosomenelementen zu suchen sein.

9. Die *Aegilops triuncialis* $\times$ *Triticum aestivum*-Bastarde machen in ihrem cytologischen Verhalten den Eindruck von stark stoffwechselphysiologisch geschädigten Pflanzen. Die Ursachen für die Stoffwechselschäden sind endogener Natur, d. h. wahrscheinlich in der genetischen Konstitution der Bastardzygoten zu suchen.

10. Die Kryptogonomerietheorie BLEIERS trifft auf die Verhältnisse in den untersuchten Bastarden nicht zu. In mehrpoligen Kernen sind die Chromosomen willkürlich und zufällig auf die Spindeln verteilt und *nicht* nach väterlichen und mütterlichen Genomen aussortiert. In somatischem Gewebe treten auch mehr als zwei Spindeln auf.

11. Die genomanalytische Methode KIHARAS ist auf die untersuchten Bastarde auch nicht annäherungsweise anwendbar. Ein großer Prozentsatz der untersuchten Pollenmutterzellen enthält gar nicht die vollständigen väterlichen und mütterlichen Genome. Die Streuung in der Anzahl von Bivalenten wird dadurch, wie vermutlich auch aus anderen Gründen so hoch, daß sich daraus keinerlei Rückschlüsse auf gemeinsame Genome oder das Fehlen gemeinsamer Genome ziehen lassen.

Literatur

- BALLY, W.: Die Godronschen Bastarde zwischen *Aegilops*- und *Triticum*-arten. Vererbung und Zytologie. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **20**, 177—240 (1919). — BERG, H. v.: Autosyndese in *Aegilops triuncialis* L. $\times$ *Secale cereale* L. Z. Züchtung **17**, 55—69 (1932). — BLEIER, H.: Untersuchungen über das Verhalten der verschiedenen Kernkomponenten bei der Reduktionsteilung von Bastarden (Kryptogonomerietheorie). Cellule **40**, 85—144 (1930). — BRABEC, F.: Zytologische Untersuchungen an den Burdonen *Solanum nigrum-lycopersicum*. Planta (Berl.) **37**, 57—95 (1949). — Untersuchungen über die Natur der Winklerschen Burdonen auf Grund neuen experimentellen Materials. Planta (Berl.) **44**, 562—606 (1954). — GAUL, H.: Asynapsis und ihre Bedeutung für die Genomanalyse. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 69—100 (1954). — GLÄSS, E.: Untersuchungen über die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. **43**, 359—403 (1955); **44**, 1—58 (1956). — KIHARA, H.: Considerations on the evolution and distribution of *aegilops* species based on the analyser-method. Cytologia **19**, 336—357 (1954). — KUCKUCK, H.: Report to the Government of Iran on the distribution and variation of cereals in Iran. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome — August 1957. Report No 517. — LILIENTHAL, F. A., and H. KIHARA: Genome-analysis in *Triticum* and *Aegilops*. X. Concluding Review. Cytologia **16**, 101—123 (1951). — MARQUARDT, H.: Neuere Auffassungen über einige Probleme der Pathologie der Zellteilungen. Naturwiss. **37**, I 416—424, II 433—438 (1950). — MATSUMOTO, K.: Zur Kritik der Kryptogonomerietheorie von BLEIER. Mem. Coll. Agr. Kyoto **25**, 1—10 (1933). — OEHLER, E.: Untersuchungen über Ansatzverhältnisse, Morphologie und Fertilität bei *Aegilops*-Weizenbastarden. I. Teil. Die F_1 -Generation. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **64**, 95—153 (1933). II. Teil. Die F'_2 u. F_3 -Generation. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **66**, 49—92 (1933). — OEHLKERS, FR., u. G. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 136—156 (1949). — Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 429—438 (1951). — PERCIVAL, J.: Cytological studies of some hybrids of *aegilops* spec. $\times$ wheats and of some hybrids between different species of *aegilops*. J. Genet. **22**, 201—278

(1930). — PFITZER, P.: Konstanz und Variabilität der Chromosomenzahl bei einigen Anthurien unter besonderer Berücksichtigung der B-Chromosomen. *Chromosoma* (Berl.) 8, 545—572 (1957). — POHLENDT, G.: Cytologische Untersuchungen an Mutanten von *Antirrhinum majus* L. I. Deletionen im uni-Chromosom. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 80, 281—288 (1942). — SEARS, E. R.: The cytology and genetics of the wheats and their relatives. *Advanc. Genet.* 2, 239—270 (1948). — THERMAN, E., u. S. TIMONEN: Multipolar spindles in human cancer cells. *Hereditas* (Lund) 36, 393—405 (1950). — WOLL, E.: Einwirkung von Nukleinsäuren und ihren Baustoffen auf die Wurzelspitzenmitose. *Chromosoma* (Berl.) 5, 391—427 (1953).

Dr. GISELA POHLENDT, Institut für Gärtnerische Pflanzenzüchtung
der Technischen Hochschule Hannover

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

DREIFARBENPANASCHIERUNG BEI *OENOTHERA* II
WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN GEWEBEN MIT ZWEI ERBLICH
VERSCHIEDENEN PLASTIDENSORTEN

Von

WILFRIED STUBBE

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. November 1957)

A. Einleitung

In der vorigen Mitteilung über Dreifarbenpanaschierung (STUBBE 1957) wurde gezeigt, daß man einen dreifarbigten Bastard herstellen kann, indem auf dem Wege der Kreuzung drei unterschiedlich ergrünungsfähige Plastidensorten kombiniert werden. Eine „gemischte“ Eizelle wurde von Pollen befruchtet, der eine dritte Plastidensorte übertrug. Auf diese Weise wurde die Zygote dreifach heteroplastomisch. Im Verlaufe der somatischen Entmischung der erblich verschiedenen Plastiden entstand eine Chimäre, die dreierlei verschiedenfarbige Assimilationsgewebe besaß. Die Ausbildung der auf Plastomdifferenzen beruhenden intrazellulären Merkmale war ziemlich streng plastidenspezifisch, so daß die drei Chloroplastenphänotypen nachweislich nebeneinander in „Mischzellen“ ohne Übergangsformen zur Ausbildung kamen. Eine Beeinflussung der einen oder anderen Plastidensorte durch die ihr benachbarte war nicht oder im äußersten Falle nur bezüglich der Stärkebildung wahrzunehmen (STUBBE 1957, Fig. 9).

Im folgenden wird eine andere Dreifarbenpanaschierung analysiert, die unerwartet an Bastarden auftritt, zu deren Zygote jeder Elter jeweils nur eine einzige Plastidensorte beigesteuert hat. Es wäre also nach den bisherigen Erfahrungen an *Oenotheren* hier zu erwarten gewesen, daß der Bastard nur zweifarbig panaschiert sein würde.

Den Begriff der Dreifarbigkeit beziehen wir hierbei nicht auf die Laubfärbung im allgemeinen, sondern nur auf die Färbung der Chloroplasten des Mesophylls. Klar erkennbar ist die Färbung am besten in mikroskopischen Querschnittspräparaten, bei denen die Interzellularenluft durch Infiltration von Wasser entfernt worden ist. Die Beurteilung der Chloroplastenfarbe nach der mit bloßem Auge sichtbaren Färbung des Laubes oder einzelner Blattbezirke ist dagegen nur mit Einschränkungen möglich, da der Betrachter Mischfarben, wie sie z. B. bei Periklinalchimären mit verschiedenfarbigen Zellschichten auftreten, nicht ohne weiteres als solche erkennt.

B. Ergebnisse

Der Bastard *albicans* · *velans*, der gewonnen wird aus der Kreuzung *Oe. suaveolens* (oder *Oe. biennis*) × *Oe. Lamarckiana*, ist mit den Plastiden der Mutter normalgrün, mit den Plastiden der *Oe. Lamarckiana* in bestimmten Entwicklungsstadien

jedoch bleich¹. Das gilt vor allem für junge Rosettenpflanzen, die im Gewächshaus heranwachsen. Diese Beobachtung wurde von RENNER (1924, S. 322; 1952) bereits mitgeteilt. In unseren Kreuzungen zwischen verschiedenen Sippen von *Oe. suaveolens* und *Oe. Lamarckiana*² war der Bastard *albicans* · *velans* ziemlich häufig von väterlichen (*Lamarckiana*-)Plastiden bleich gescheckt (STUBBE 1953, S. 201). Wenn man, solange das Ausbleichen noch gut erkennbar ist, von diesen Pflanzen Sektoren auswählt, deren Zweige rein mit *Lamarckiana*-Plastiden ausgestattet sind, kann man später daraus durch Selbstbestäubung wieder *albicans* · *velans* (*albivelutina*) als konstanten Bastard gewinnen, der nur



Abb. 1. Sechs Wochen alte Keimlinge von *Oe. albivelutina* mit *Lamarckiana*-Plastiden

Lamarckiana-Plastiden besitzt und deshalb die Entwicklungsgeschichte des Ausbleichens und Wiederergrünes besonders klar demonstriert (Abb. 1 und 2). [Der Bastard ist komplexheterozygot und halbheterogam (*albicans* ♀ · *velans* ♂♂); seine Diakineseconfiguration ist ein 14er-Ring. Die *velans*-Homozygoten erscheinen als taube Samen (RENNER 1916, 1917).] Die *albivelutina*-Pflanzen sind trotz des Chlorophylldefekts noch relativ gut entwicklungsfähig. Das hängt damit zusammen, daß die Degeneration der Chloroplasten in den verschiedenen Zellen sehr uneinheitlich abläuft und teilweise unterbleibt (vgl. auch weiter unten).

Aus den Abb. 1 und 2 der *albivelutina* mit *Lamarckiana*-Plastiden ist zu ersehen, daß eine Scheckung durch grüne Plastiden von andersartiger Erbkonsti-

¹ Als „bleich“ bezeichnen wir eine fast weiße Laubfarbe, deren grünlicher Schimmer auf einer relativ inhomogenen Verteilung feinsten grüner Fleckchen beruht. Ebenso bleich wie *albicans* · *velans* verhält sich der Bastard *albicans* · *hookeri* mit *Lamarckiana*-Plastiden. Im Prinzip handelt es sich dabei um denselben Typ von Chlorophylldefekt, wie wir ihn viel stärker ausgeprägt bei dem Bastard *velans* · *hookeri* mit *Lamarckiana*-Plastiden zum ersten Mal kennenlernten (RENNER 1922, S. 236; SCHÖTZ 1954, S. 217). Er tritt auch bei der homozygotischen *Oe. Hookeri* auf, wenn sie *Lamarckiana*-Plastiden besitzt (siehe auch STUBBE 1955, Abb. 7). Mit den Plastiden der *Oe. Hookeri* sind die genannten Genotypen genau so normalgrün wie mit *suaveolens*-Plastiden.

² Es handelt sich bei unseren Kreuzungen um die von HERIBERT NILSSON stammende *Oe. Lamarckiana* des Renner-Sortiments. Wie von KAPPUS (1957) mitgeteilt wurde, kommen in Deutschland auch Wildformen vom gleichen Genotyp vor, deren Plastom aber einen anderen genetischen Charakter besitzt.

tution nur in den Bezirken zu beobachten sein wird, in denen die *Lamarckiana*-Plastiden wirklich bleich sind bzw. sein würden. Da wir aus bestimmten Gründen eine ständige Unterscheidbarkeit der väterlichen und mütterlichen Plastiden sicherstellen wollten, verwendeten wir deshalb für die Erzeugung der *albivelutina* eine *Oe. suaveolens* mit mutierten gelbgrünen Plastiden¹. Die mutierten gelbgrünen Plastiden können auch mit dem Genom *albicans · velans* nicht voll ergrünen und unterscheiden sich daher sowohl von bleichen wie auch von grünen *Lamarckiana*-Plastiden. In dieser Kreuzung sollte nun in den Bezirken der *albivelutina*, in denen die *Lamarckiana*-Plastiden gewöhnlich bleich sind, statt



Abb. 2. Kotyledonen und Rosettenblätter von 2 Monate alten *albivelutina*-Pflänzchen in der Reihenfolge ihrer Anlage. Der Chlorophylldefekt der *Lamarckiana*-Plastiden ist auf bestimmte Blattbezirke beschränkt

der bisherigen Bleich-Grün-Panaschierung eine Bleich-Gelbgrün-Scheckung auftreten. Zwar bestätigte sich diese Erwartung im allgemeinen, jedoch war es auffällig, daß häufig auf den Blättern neben bleichen und gelbgrünen Sektoren auch satter grüne Sektoren in Erscheinung traten (Abb. 3, 4, 5 und 6). Dieses Grün konnte nicht ohne weiteres aus den bekannten Scheckungsverhältnissen erklärt werden, es konnte nicht die Mischfarbe von Bleich und Gelbgrün, sondern mußte etwas Neues sein. (Wie später an mikroskopischen Präparaten bestätigt werden konnte, war hier tatsächlich eine echte dritte Farbe hinzugekommen.)

Das unverhoffte Auftreten des grünen Gewebes kann grundsätzlich entweder modifikativ oder durch eine erbliche Veränderung bedingt sein. Sollte das Grün wirklich einen neuen Idiotyp repräsentieren, so müßte es auch möglich sein, durch (eventuell wiederholte) Selbstbestäubung daraus rein grüne Nachkommen zu züchten. Dieser Versuch wurde ausgeführt². 1954 waren einige Gewächshaus-

¹ Diese spontan aufgetretene Plastommutante fanden wir 1950 bei *Oe. suaveolens* Sippe Fünfkirchen. Das bei vorliegenden und anderen Untersuchungen verwendete *Oenotheren*-Sortiment verdanken wir zum überwiegenden Teil der Güte unseres Lehrers, Herrn Prof. Dr. O. RENNER.

² Der Versuch hätte bei Kenntnis der histologischen Verhältnisse eines umfangreicheren Materials wohl unterbleiben können, wie die weitere Untersuchung zeigt.

exemplare verfügbar, die noch in der Blütenregion deutliche Dreifarbenpanaschierung zeigten. Neben solchen von sektorial grünscheckigen Brakteen wurden auch Blüten aus der Achsel von Tragblättern mit hellgrüner Spreite und normalgrünem Rand oder grüner Spreite mit gelbgrünem Rand geselbstet. Unter den über 200 Nachkommen befanden sich gelbgrüne, bleiche und dreifarbige



Abb. 3

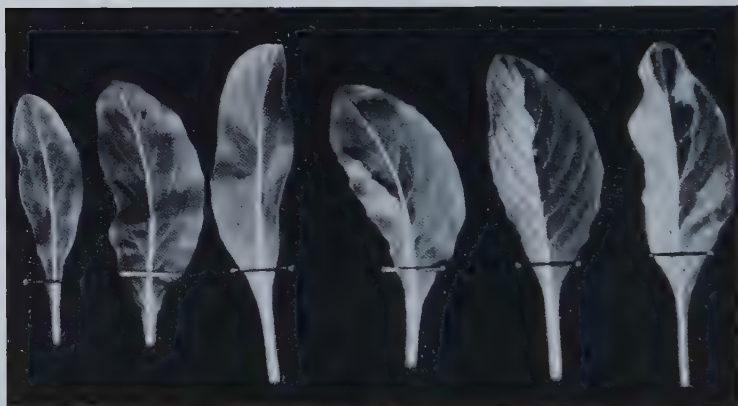


Abb. 4

Abb. 3 u. 4. Dreifarbig panaschierte Blätter von jungen *albivertulina*-Rosetten

Pflanzen, jedoch keine, die entweder überwiegend grün waren, oder bei denen ein größerer Sektor des Sproßvegetationskegels rein grüne Zweige gebildet hatte, so daß man daraus durch erneute Selbstung hätte eine rein grüne Nachkommenschaft gewinnen können. Auch gab es dort keine grünen Nachkommen, wo es vielleicht zu erwarten gewesen wäre, nämlich bei Zweigen, deren Brakteen eine hellgrüne Spreite (Grün über Gelbgrün) und einen normalgrünen Rand besaßen: In diesem Fall war die Nachkommenschaft stets bleich! (Bei gelbgrünem Rand war sie erwartungsgemäß gelbgrün.)

Da eine erbliche Fixierung von Grün demnach nicht vorliegen kann, muß man annehmen, daß eines der beiden normalerweise chlorophylldefekten Gewebe dieser Plastomchimäre modifikativ in bestimmten Blattsektoren ergrünt ist.

Bei der Prüfung dieser Möglichkeit war in erster Linie das Augenmerk auf die Verteilung bzw. Anordnung der verschiedenfarbigen Gewebe zu richten, wie sie sich aus der Untersuchung von Blattquerschnitten ermitteln läßt. Dazu braucht man aber ein etwas umfangreicheres Pflanzenmaterial, als bisher vorlag. Um es zu erhalten, war die bunte *albivelutina* unabhängig von den oben genannten Selbstungen mehrmals neu hergestellt worden. Sie wurde nun nicht mehr aus der Kreuzung *Oe. suaveolens* gelbgrün $\times$ *Oe. Lamarckiana* gewonnen, sondern Zweige der *albivelutina* mit gelbgrünen mutierten *suaveolens*-Plastiden wurden mit der bleichen *albivelutina* (mit *Lamarckiana*-Plastiden) in beiden Richtungen gekreuzt. So erhielten wir wieder zu einem Teil dreifarbige Nachkommen, die unter Berücksichtigung der histologischen Verhältnisse analysiert wurden.

Über die im Verlauf der Ontogenese sich ergebenden Veränderungen der durch Plastidenentmischung entstehenden Blattmuster seien hier einige Zwischenbemerkungen eingefügt: Derartige Muster ergeben sich (abgesehen von der zufallsmäßigen Verteilung der Plastiden bei der Zellteilung) aus der Wachstumsweise der aus Tunica- und einem Corpus aufgebauten Meristeme. In welchem Umfange Tunica und Corpus sich am Aufbau des Blattes beteiligen und dort als „Kern“ und „Mantel“ wieder erscheinen, ist von Idiotyp zu Idiotyp verschieden. Die ontogenetische Zusammengehörigkeit einzelner Zellkomplexe kann aber durch verschiedenfarbige Plastiden leichtbar gemacht werden (RENNER

1936b). Erfahrungsgemäß entwickelt sich bei *Oenothera* aus dem ursprünglichen fleckigen Checkungszustand (*status albomaculatus* bzw. *paralbomaculatus*) über den noch labilen Zustand sektorialer Panaschierung der so gut wie stabile Endzustand der periklinalen Anordnung verschiedenfarbiger Gewebe (*status albotunicatus* oder *albonucleatus* nach CORRENS 1919) (vgl. auch RENNER 1936a). Ebenso gut kann sich auch ein und dieselbe Plastidensorte in der Tunica wie im Corpus durchsetzen und dadurch der einfarbige Zustand des Vegetationskegels hergestellt werden. Bei unseren Periklinalchimären läßt die Farbe des Blattendes Schlüsse auf das Plastom der 2. Tunicaschicht und der daraus hervorgehenden Keimzellen zu, denn die Randpartie des Blattes besteht allein aus Mantelgewebe. Die frühen Entwicklungsstadien der Pflanze bestehende Instabilität des Vegetationskegels hinsichtlich seiner plastomischen Konstitution ist zunächst auf die Entmischungsvorgänge zurückzuführen. Später, wenn die Entmischung beendet ist und die verschiedenen Plastidensorten sektorial verteilt sind, kann sich die Grenze zwischen den Sektoren noch so lange verschieben, bis die Initialzellen einer Schicht völlig plastomgleich geworden



Abb. 5. Dreifarbig panaschierte Blätter einer im Gewächshaus gezogenen blühenden *albivelutina*. Linkes Blatt: linke Hälfte grün mit gelbgrünem Rand, rechte Hälfte bleich; mittleres Blatt: linke Seite bleich, rechte Seite grün mit bleichem Rand; rechtes Blatt: beide Hälften grün mit bleichem Rand; die Pfeile geben die Lage der Querschnitte Nr. 13 und 14 in Abb. 8 an

sind¹. Eine Mannigfaltigkeit in der Anordnung der verschiedenfarbigen Gewebe ist vorwiegend bei jüngeren Pflanzen anzutreffen, und man muß dann die mikroskopische Untersuchung von Blattquerschnitten anwenden, um ein eindeutiges Bild von der Plastidenverteilung zu bekommen.

Die Blattquerschnitte unserer dreifarbig Panaschüre ließen erkennen, daß die makroskopisch für einheitlich grün angesehenen Sektoren im Gegensatz zu den bleichen und gelbgrünen Bezirken uneinheitlich sind: Die betreffenden Sektoren sind aus gelbgrünen und normalgrünen Schichten (in periklinaler Anordnung) zusammengesetzt! Wir fanden ferner, daß dabei die grünen



a



b

Abb. 6a u. b. a Dreifarbig panaschiertes Rosettenblatt einer 2jährigen *albivelutina*. b Schematische Darstellung desselben Blattes. ▨ Schwach ergrünter („bleicher“) Blattbezirk, der allmählich in besser ergrünte Bereiche ▨ übergeht; ▨ gelbgrüner Bereich; ▨ normalgrüner Sektor mit scharfer Begrenzung gegenüber Bleich und Gelbgrün

Schichten sowohl dem Kern wie auch dem Mantel angehören können. Zwischen bleichen und makroskopisch grünen sowie zwischen grünen und gelbgrünen Sektoren bestehen scharfe Grenzen. Wenn man eine gelbgrüne Schicht von einem makroskopisch grünen Sektor bis in einen reingelbgrünen Blattabschnitt verfolgt und den Plastidenphänotyp genau betrachtet, so stellt man fest, daß die gelbgrünen Plastiden sich überall gleichen. Übergangsformen zwischen gelbgrünen und normalgrünen Plastiden lassen sich nicht finden². Dieser phänotypischen Konstanz der mutierten *suaveolens*-Plastiden steht eine weitgehende Modifizierbarkeit der *Lamarckiana*-Plastiden

unter dem Genom *albicans* · *velans* gegenüber. Wir gehen deshalb wohl nicht fehl, wenn wir die Hypothese aufstellen, daß die grünen Plastiden (in den makroskopisch grünen Sektoren) mit den bleichen *Lamarckiana*-Plastiden erblich identisch sind. Man muß annehmen, daß sie nur deshalb grün sind und normale Gestalt besitzen, weil sie einer Beeinflussung durch die benachbarten

¹ Vergleicht man *Oenothera* mit spiraliger Blattstellung und *Epilobium* mit dekussierter Blattstellung miteinander, so hat es den Anschein, daß die sektorialchimärische Struktur des Vegetationskegels bei *Epilobium* im Zusammenhang mit den morphologischen Eigenheiten bedeutend stabiler ist als bei *Oenothera* (vgl. hierzu MICHAELIS 1957b, S. 68 und Abb. 6).

² Grüne und gelbgrüne Zellen sind bei Gewächshausexemplaren nicht gerade leicht im Mikroskop zu unterscheiden, wenn man sich allein auf die Farbdifferenz beziehen will; denn unter gedämpften Lichtverhältnissen können die gelbgrünen mutierten *suaveolens*-Plastiden noch relativ gut ergrünen. Man kommt aber zu klaren Ergebnissen, wenn man wie in der vorausgegangenen Untersuchung (STUBBE 1957) berücksichtigt, daß die gelbgrünen Plastiden einen geringeren Durchmesser haben und stärkerfrei sind.

Zellschichten mit mutierten gelbgrünen *suaveolens*-Plastiden ausgesetzt sind. Zu prüfen bleibt lediglich, ob ein derartiger Effekt regelmäßig auftritt, und ob eventuell Einschränkungen vorkommen, die sich daraus ergeben können, daß der Einfluß, den die gelbgrünen Gewebeschichten auf die mit *Lamarckiana*-Plastiden ausgestatteten ausüben, in seiner Reichweite wie in seiner Richtung begrenzt ist. Bei Regelmäßigkeit eines solchen Einflusses entstehen für die bei der somatischen Plastidenentmischung erfolgende Musterbildung ganz bestimmte Folgen: Gewisse ursprünglich erwartete Kombinationen von Bleich mit Gelbgrün werden dann stets durch solche von Grün mit Gelbgrün ersetzt sein; außerdem darf es die Kombination von Bleich mit Grün in periklinaler Anordnung nicht geben.

Um unsere Hypothese zu prüfen und zugleich Einzelheiten bezüglich der Richtung und der Reichweite des angenommenen Einflusses zu ermitteln, haben wir durch die verfügbaren dreifarbig panaschierten Blätter (Abb. 5 und 7) Querschnitte gemacht und diese in schematischen Zeichnungen (Abb. 8) festgehalten.

Die Auswertung der mikroskopischen Präparate wird dadurch kompliziert, daß die *Lamarckiana*-Plastiden der *albivelutina* nur in bestimmten Blattbezirken sind. Man muß deshalb die Topographie der bleichen Gewebe einer rein mit *Lamarckiana*-Plastiden ausgestatteten *albivelutina* kennen, um entscheiden zu können, welche Zellbezirke bei den dreifarbig panaschierten ausschließlich infolge der

Einkreuzung von mutierten gelbgrünen *suaveolens*-Plastiden normal ergrün sind. Außerdem erscheint es für Überlegungen über den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen den verschiedenfarbigen Zellschichten von Wert zu sein, wenigstens in großen Zügen die Veränderungen des Plastidenphänotyps in den bleichen Blattbezirken zu kennen. Wie Abb. 1 und 2 erkennen lassen, ist der Chlorophylldefekt an den ersten Blättern der jungen Sämlinge am stärksten ausgeprägt. Von den Kotyledonen ist nur die Basis

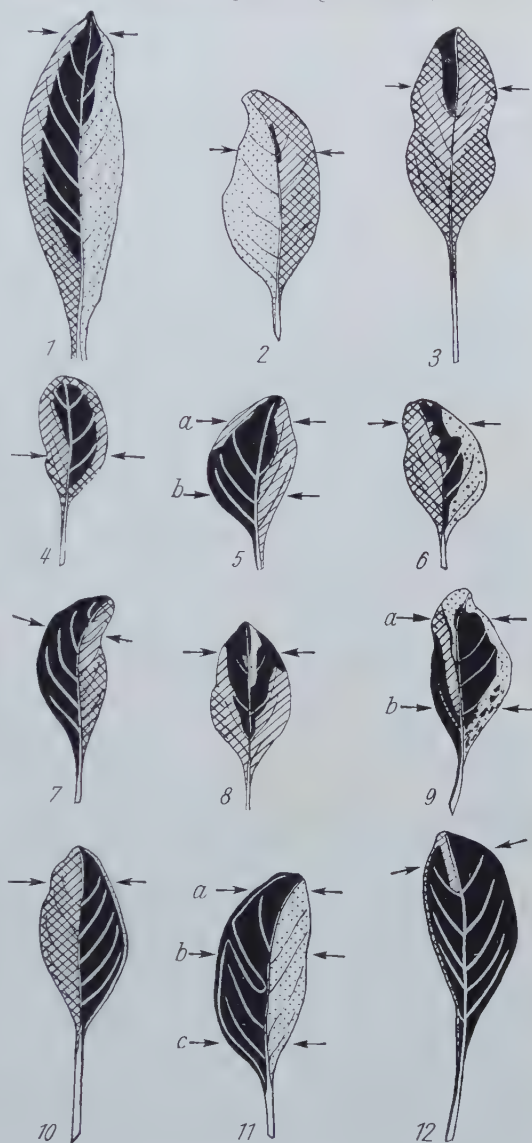


Abb. 7. Schematische Darstellung dreifarbig panaschierter Blätter, von denen Querschnitte gemacht wurden. Signatur wie in Abb. 6. Die Pfeile geben die Lage der in Abb. 8 dargestellten Querschnitte an

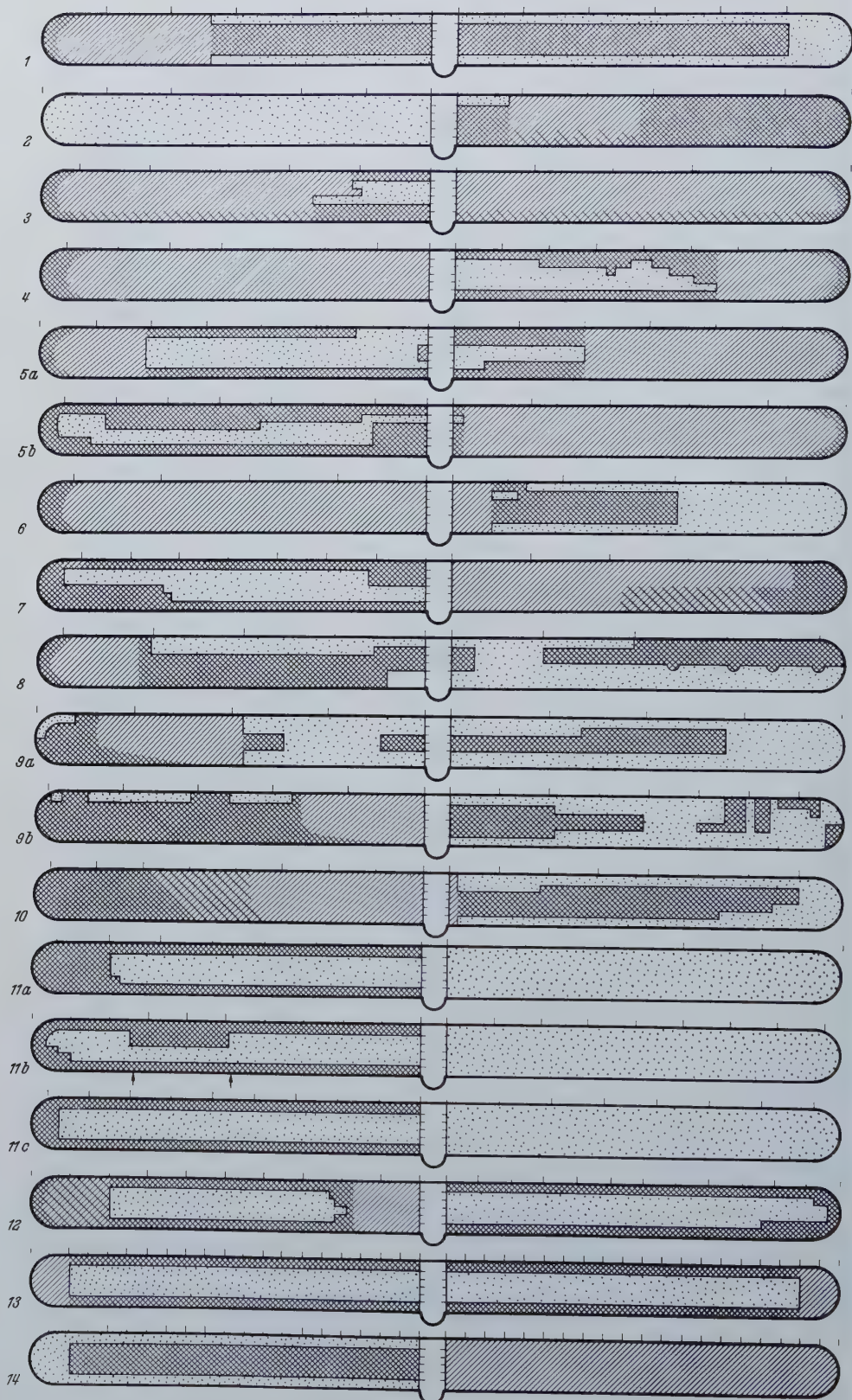


Abb. 8. (Unterschrift s. S. 197)

bleich, während der distale Teil normal grün ist. Offenbar ergrünt nur der nach der Keimung neu hinzuwachsende Teil der Keimblattspreite nicht, während die im Samen bereits am fertigen Embryo vorhandenen Zellen, von denen man annehmen darf, daß ihre Plastiden vor der Keimung schon eine bestimmte Differenzierungsstufe erreicht hatten, normal ergrünen. Die ausgewachsenen Primärblätter sind vor allem im mittleren Teil der Spreite bleich, am Blattrand dagegen relativ gut grün. Dazwischen liegt eine Zone glitenden Übergangs. An den Folgeblättern kann der Umfang des bleichen Bezirks und seine Lage wechseln. Die Umweltbedingungen dürften von einigem Einfluß darauf sein. Daß der Chlorophylldefekt an älteren Pflanzen zeitweilig ganz verschwindet, liegt offenbar in einer (reversiblen) Veränderung ihres physiologischen Zustandes begründet. In den neugebildeten Blättern wird dann die Entwicklung der Chloroplasten von Anfang an in normale Bahnen gelenkt. Daneben können aber auch, wie man beobachten kann, weniger stark bleiche Blattbezirke wieder ergrünen. Vor allem bei zweijähriger Kultur der Pflanzen kann man auch eine Wiederholung des Ausbleichens beobachten. Wenn man die *albivelutina* mit *Lamarckiana*-Plastiden im Sommer im Gewächshaus zum Blühen bringt, läßt sich der Chlorophylldefekt noch in der Brakteenregion deutlich feststellen. Er greift dann auch auf den Blattrand der Periklinalchimären über (vgl. Abb. 5).

An den Querschnittspräparaten von bleichen Blättern junger Rosetten fällt zunächst auf, daß die Zellen ganz außen am Blattrand und die Parenchymzellen in der Umgebung von kleineren Leitbündeln, gelegentlich auch die Zellen der untersten Schwammparenchymschichten normalgestaltete Chloroplasten in gewohnter Anzahl enthalten (über 20). Im Gegensatz dazu enthalten die Zellen der bleichen Bezirke nur wenige (bis herab zu 2) stark vakuolisierte, fast farblose Plastiden. Zwischen diesen Extremen gibt es in der Übergangszone Zellen, deren Plastiden weniger stark degeneriert sind. Man kann jedoch nicht mit Sicherheit eine Aussage darüber machen, ob die vorkommenden Abwandlungen vom normalen Plastidenphänotyp einer einzigen Entwicklungsreihe angehören, und wie sie aufeinanderfolgen. Als Anzeichen einer nur geringfügigen Entwicklungsstörung darf man wohl die optisch erkennbare Verminderung des Chlorophyllgehaltes bei unveränderter Gestalt der Plastiden ansehen. An bestimmten Stellen der Übergangszone von Grün nach Bleich gibt es Zellen, deren Plastidenzustand besonders interessant ist: Die noch deutlich grünen Chloroplasten sind nur in geringer Zahl vorhanden (bis herab zu 2), doch ihre Größe hat oft stark zugenommen (von 2 bis auf 20 μ im Durchmesser)¹. Wenn dabei noch eine leichte Vakuolisierung eintritt, sieht man ohne sonstigen Eingriff sehr deutlich den Schichtenbau dieser Chloroplasten (Abb. 9)². Das spätere Nachergrünen bleicher Blätter geht wahrscheinlich von Zellen mit weniger geschädigten Plastiden aus. Das schließen wir daraus, daß auf alten Blättern manchmal ein feines Mosaik von grünen und weißen (bleichen) Zellen zu finden ist. „Pseudomischzellen“, die normale und vakuolisierte *Lamarckiana*-Plastiden nebeneinander enthalten, kommen gelegentlich auch vor. In günstigen

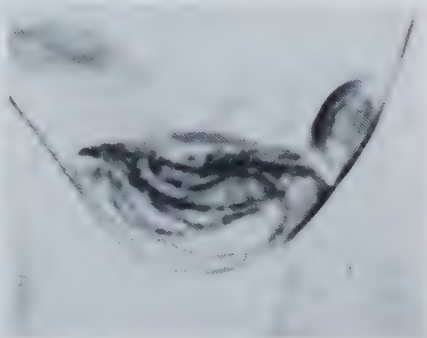


Abb. 9. Degenerierender, stark vergrößerter Chloroplast aus der Übergangszone zwischen bleichen und grünen *Lamarckiana*-Plastiden, den Schichtenbau zeigend. Daneben ein kleiner Chloroplast von normalem Durchmesser. Primärvergrößerung 900fach

¹ Ein ähnliches Phänomen beschreibt BARTELS (1957) bei *Epilobium*-Bastarden.

² Herrn Dr. C. STUMM danke ich für seine Mitarbeit bei der Mikrophotographie dieser Plastiden.

Abb. 8. Schematische Darstellung von Querschnitten durch dreifarbig panaschierte Blätter der *Oc. albivelutina*. ▨ Bleiche *Lamarckiana*-Plastiden; ▩ grüne (*Lamarckiana*-)Plastiden; ▤ Übergangsformen zwischen diesen beiden; ▥ gelbgrüne mutierte *suaveolens*-Plastiden. Die Epidermis ist nicht als Zellschicht eingezeichnet; die 6 Schichten des Mesophylls (2 Palisaden- und 4 Schwammparenchymschichten) sind mit ihren Grenzen in der Mittelrippe durch Strichmarken wiedergegeben; auf der Blattoberseite geben die Strichmarken den Abstand von etwa 50 zu 50 Palisadenzellen wieder. Die Nummern der Schemata stimmen mit denen der Abb. 7 überein

Fällen ist es möglich, daß ein zunächst bleiches Blatt später voll ergrünt, wie es dem „*virescens*-Typ“ entsprechen würde. Bei den meisten bleichen Blättern bleibt jedoch trotz des Nachergrünens ein bleicher Bezirk (Spiegel oder Binde) erhalten, in welchem der Chlorophylldefekt nicht mehr ausgeglichen werden kann, weil hier die Plastiden zu stark und damit irreversibel geschädigt waren.

Bei der Auswertung der Blattquerschnittspräparate kann man die besonderen Verhältnisse, die sich aus der Variabilität des auf einer Degeneration der *Lamarckiana*-Plastiden beruhenden Chlorophylldefektes ergeben, nämlich den allmählichen Übergang von Bleich nach Grün am besten dadurch berücksichtigen, daß man zur Analyse der Dreifarbenpanaschierung nur solche Teile heranzieht, bei denen das Auftreten von Grün als dritte Farbe dadurch sichergestellt ist, daß einem grünen Sektor in einer Spreitenhälfte ein entsprechender bleicher in der anderen Spreitenhälfte gegenübersteht. Auswertbar erscheinen uns auch solche grüne Flecken, die allseits von bleichem Gewebe umgeben sind. (In unseren schematischen Abb. 7 und 8 finden sich auch einige Fälle, die dieser Forderung nicht entsprechen. Die Nummern der Abb. 8 stimmen mit denen der Abb. 7 überein, wo die Lage der Blattquerschnitte jeweils eingezeichnet ist.)

Ausgehend von der Voraussetzung, daß von gelbgrünen Zellen ein Einfluß auf die Entwicklung der in den Nachbarzellen vorhandenen *Lamarckiana*-Plastiden ausgeübt wird, überrascht zunächst die Feststellung, daß dieser Einfluß auf die senkrechte Richtung im Blattquerschnitt beschränkt ist. Die Durchmusterung der Querschnittsbilder zeigt, daß gelbgrüne und bleiche Zellen wohl seitlich, d. h. in der Transversalebene, aneinandergrenzen, in der Senkrechten ist jedoch stets bleiches Gewebe durch normalgrünes ersetzt. Nur ausnahmsweise vermitteln gelegentlich eine bis mehrere grüne Zellen in der Transversalebene zwischen Bleich und Gelbgrün (Abb. 8, Nr. 8 und 12). Im allgemeinen besteht also eine klare Richtungsgebundenheit für die Wechselwirkung zwischen gelbgrünem und grünem bzw. bleichem Gewebe. Auf die sich daraus für die Farbe des Blattrandes ergebenden Folgerungen werden wir noch zurückkommen. Zunächst betrachten wir die Verhältnisse im Bereich der Blattspreite genauer in Richtung von der Blattoberseite zur Blattunterseite und umgekehrt. Für Überlegungen, die sich mit der Frage nach der Natur des wirksamen Agens befassen, ist es wichtig zu wissen, wieweit die Wirkung einer oder mehrerer gelbgrüner Zellschichten reicht, und ob dabei ihre Lage im Bereich der 6 Mesophyllschichten eine Rolle spielt. (Es wäre z. B. denkbar, daß ein hierfür verantwortlicher Stoff den Wanderweg der Assimilate benutzen würde.) Die Querschnitte Nr. 13 und 14 (linke Hälfte) zeigen uns zunächst, daß es keine Rolle spielt, ob der Kern oder der Mantel die gelbgrünen Plastiden enthält. In diesen Fällen sind die Nachbarschichten stets grün und nicht bleich. Eine noch größere Bedeutung kommt aber den Fällen zu, wo nur eine einzige gelbgrüne Schicht vorhanden ist. Wir konnten sie bisher für die 1., 2., 4. und 5. Schicht nachweisen (Querschnitte Nr. 2, 5b, 3, 4). In allen Fällen waren sämtliche übrigen Mesophyllschichten normalgrün. Man darf annehmen, daß sich dieselbe Wirkung einstellen wird, wenn die gelbgrünen Zellen die 3. oder 6. Mesophyllschicht einnehmen. Jedenfalls wurde niemals bisher beobachtet, daß der Einfluß der gelbgrünen Schicht sich nicht auf alle übrigen Mesophyllschichten zusammen ausgedehnt hätte, so daß die letzte Schicht vielleicht noch bleich gewesen wäre. Eine Begrenzung der Reichweite ist also in der Senkrechten weder von unten nach oben noch in umgekehrter Richtung jemals

beobachtet worden. Steht die Regel fest, daß eine einzige gelbgrüne Schicht in der Lage ist, alle übrigen darüber- oder darunterliegenden Zellschichten, welche *Lamarckiana*-Plastiden enthalten, normal ergrünen zu lassen, so kommt der Frage, welche von den übrigen 64 Kombinationsmöglichkeiten beliebig angeordneter Schichten mit diesen 2 Plastidensorten tatsächlich beobachtet wurden, eine besondere Bedeutung zu. (In unseren Präparaten waren es etwa 20 verschiedene Kombinationen.) Eine andere Frage ist es, ob uns diese verschiedenen Kombinationen von Gelbgrün und Grün stets makroskopisch als ein und dieselbe Intensität von Grün erscheinen. Das kann verneint werden. Es lassen sich bei aufmerksamer Untersuchung in solchen Fällen wirklich verschiedene Abstufungen von mehr oder weniger intensivem Grün erkennen. Ein solcher Fall ist bei dem Blatt Nr. 11 (Abb. 7) gegeben, wo der dunklere Teil der linken Spreitenhälfte durch weiße Umrahmung angegeben wird. Im Blattquerschnitt 11b (Abb. 8) weisen zwei Pfeile auf den dunkleren Sektor hin. Eine weitere Frage, ob auch mutierte *suaveolens*-Plastiden in der Epidermis die *Lamarckiana*-Plastiden des Mesophylls am Ausbleichen hindern können, wird wohl negativ beantwortet werden müssen, denn grüne Sektoren ohne eine gelbgrüne Mesophyllschicht waren nicht zu finden.

Die Untersuchung des Blattrandes von Periklinalechimären mit gelbgrünem Corpus kann in den Fällen, wo das Ausbleichen der *Lamarckiana*-Plastiden noch den Blattrand erfaßt, eine Bestätigung der zu Anfang festgestellten Richtungsgebundenheit der von den gelbgrünen Zellen ausgehenden Wirkung erbringen.

Aus praktischen Gründen vereinbaren wir, für unsere Untersuchungen den Blattrand so zu definieren, daß wir darunter den aus der 1. und 2. Tunicaschicht hervorgegangenen Randstreifen der Blattspreite verstehen wollen, wie er sich durch die Markierung der Tunica mit bestimmten Plastiden zu erkennen gibt. Er ist nicht immer gleich breit. Bei kleinen Blättern hat diese Zone durchschnittlich eine Breite von 15 Palisadenzellen, bei großen Blättern erwachsener Pflanzen kann sie 40—100 Zellen breit sein. Abgesehen von der äußersten Rundung ist dieser Streifen ebenso 6schichtig in Palisaden- und Schwammgewebe differenziert wie die übrige Blattspreite.

Wir fanden an blühenden Gewächshausexemplaren Blätter, die einwandfrei dreifarbig und außerdem am Rand typisch bleich waren (Abb. 5). Der Querschnitt Nr. 13 zeigt deutlich, daß der etwa 100 Palisadenzellen breite Blattrand, der bleich ist, unvermittelt an einen Spreitenteil grenzt, welcher über einem gelbgrünen Kern einen grünen Mantel trägt. Der gelbgrüne Kern übt also in seitlicher Richtung keine Wirkung auf die *Lamarckiana*-Plastiden des Blattrandes aus.

Wenn Wechselwirkungen zwischen Geweben mit Plastomdifferenzen bestehen, so darf man erwarten, daß ähnliche Wirkungen eintreten, wenn diese beiden Plastome in einer Zelle vereinigt sind. Die Untersuchung von Mischzellen wird zeigen, ob eine einzige mutierte gelbgrüne *suaveolens*-Plastide genügt, um alle anderen (*Lamarckiana*-)Plastiden derselben Zelle ergrünen zu lassen, oder ob dafür eventuell bestimmte Zahlenverhältnisse nötig sind. Bisher fanden wir nur Mischzellen von grünen und gelbgrünen Plastiden, nicht aber solche, die bleiche und gelbgrüne oder auch grüne Plastiden nebeneinander besessen hätten. Da die Beobachtungen nicht sehr umfangreich waren, kann zur Zeit noch nichts weiter darüber ausgesagt werden.

Wir haben schließlich noch die Frage geprüft, ob die Eigenschaft, das Ergrünen der *Lamarckiana*-Plastiden zu beeinflussen, nur den mutierten *suaveolens*-

Plastiden zukommt oder vielleicht auch schon den normalen *suaveolens*-Plastiden. Dazu untersuchten wir Blattquerschnitte von einer periklinalchimärischen *albivelutina*, die im Corpus *suaveolens*- und in der Tunica *Lamarckiana*-Plastiden besaß. Ebenso wie der Blattrand war hier auch der Gewebemantel über dem grünen Kern der Spreite bleich. Normalgrünes Gewebe kann das Ausbleichen der *Lamarckiana*-Plastiden also nicht verhindern.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Für die vorliegenden dreifarbig panaschierten Bastarde, die nur zwei verschiedene elterliche Plastidensorten in sich vereinigten, war zunächst nachzuweisen, daß das Grün als dritte Farbe wirklich neu zu den beiden gewohnten Gewebetypen mit bleichen und gelbgrünen Zellen hinzugetreten war. Die mikroskopische Untersuchung der Blattquerschnitte hat gezeigt, daß das Grün die natürliche Farbe von normal ausgebildeten Chloroplasten ist, welche sich mit Sicherheit von den beiden chlorophylldefekten Typen, den bleichen *Lamarckiana*-Plastiden und den mutierten gelbgrünen *suaveolens*-Plastiden, unterscheiden. Da es nicht möglich ist, aus grünen Sektoren rein grüne Pflanzen herauszuzüchten, kann man nicht annehmen, daß die grünen Gewebe eine erbliche Veränderung durchgemacht haben. Es muß also modifikatives Ergrünen einer der beiden sonst chlorophylldefekten Plastidensorten angenommen werden, wobei zu untersuchen war, mit welcher der beiden elterlichen Plastidensorten die normalgrünen identisch sind. Das Studium der Blattquerschnitte der Plasmochimären hinsichtlich der Verteilung der drei Gewebetypen führte zu der Auffassung, daß bleiche und grüne Plastiden erblich als *Lamarckiana*-Plastiden identisch sind. Bleiches Gewebe wird immer dann durch grünes vertreten, wenn sich auf dem Blattquerschnitt über oder unter den Gewebeschichten mit *Lamarckiana*-Plastiden solche mit mutierten gelbgrünen *suaveolens*-Plastiden befinden. Außerdem zeigten die Blattquerschnitte, daß innerhalb der Gewebeschichten ein Nebeneinander von gelbgrünen und bleichen Zellen möglich und wohl die Regel ist. Berücksichtigt man diese Gesetzmäßigkeiten, so ergeben sich theoretisch für Periklinalchimären von dem hier analysierten Idiotyp bestimmte Konsequenzen hinsichtlich ihres Phänotyps, die in Tabelle 1 dargestellt werden.

Tabelle 1

		Corpus (Kern)	Tunica (Mantel)		Blattrand
I. status „albo“ nucleatus	Plastom: Farbe:	<i>Lamarckiana</i> grün	mut. <i>suaveolens</i> gelbgrün	= =	mut. <i>suaveolens</i> gelbgrün
II. status „albo“ tunicatus	Plastom: Farbe:	mut. <i>suaveolens</i> gelbgrün	<i>Lamarckiana</i> grün	= ≠	<i>Lamarckiana</i> bleich

Diese Schichtenkombinationen wurden tatsächlich immer wieder vorgefunden, wogegen andere, wie z. B. grün über bleich oder bleich über gelbgrün und umgekehrt nicht beobachtet werden konnten. Solche Kombinationen hätten aber vorkommen müssen, wenn es sich bei dem Auftreten von Grün um etwas erblich Neues gehandelt hätte.

Es lag theoretisch wohl im Bereich der Möglichkeiten, daß das Auftreten von Grün die Folge einer idiotypischen Veränderung gewisser Sektoren der *albivelutina* gewesen wäre,

ohne daß hierbei eine Mutation im Genom oder Plasmon bzw. Plastom hätte angenommen werden müssen. Es würde schon genügen, daß einer der beiden Chlorophylldefekte auf einer Plastomdifferenz, der andere auf einer Plasmondifferenz außerhalb des Plastoms beruhen würde¹. Die dritte Farbe könnte dann als Folge einer Neukombination von Plasma und Plastiden auftreten. Daß die dreifarbigigen *albivelutina*-Bastarde aber nur aus zwei Plasmotypen zusammengesetzt sind, spricht dafür, daß für die beiden Chlorophylldefekte homologe Erbtäger anzunehmen sind.

Aus den Lagebeziehungen bleicher, gelbgrüner und normalgrüner Zellen zueinander ergibt sich, daß das unzeitgemäße normale Ergrünen der *Lamarckiana*-Plastiden nur in solchen Zellen stattfinden kann, denen in Richtung zur Blattober- oder Blattunterseite Zellen mit gelbgrünen mutierten *suaveolens*-Plastiden benachbart sind. Die gelbgrünen Zellen bzw. deren Plastiden üben also in der senkrechten Richtung einen bestimmten Einfluß auf die benachbarten Zellen mit *Lamarckiana*-Plastiden aus. In der Transversalebene fehlt dieser Einfluß, und die *Lamarckiana*-Plastiden sind dann trotz der seitlich benachbarten gelbgrünen Zellen bleich. Die in einigen Fällen beobachtete Ausnahme von dieser Regel, nämlich daß zwischen bleichen und gelbgrünen Zellen einige grüne vermittelten, muß zunächst unerklärt bleiben, da wir den Mechanismus dieser Wechselwirkung noch nicht kennen. Es wäre aber daran zu denken, die Verhältnisse nicht nur an Querschnitten senkrecht zur Längsachse des Blattes, sondern auch in den übrigen Richtungen weiter zu untersuchen.

Für die Frage nach der Natur des genannten Einflusses können wir die Möglichkeit ausschließen, daß es sich hier um einen rein physikalischen Strahlenschutz in Form einer Abschirmung der einen Schicht durch die darüberliegende handelt, denn das Ergrünen der *Lamarckiana*-Plastiden tritt ebenso gut bei gelbgrünem Gewebekern wie bei gelbgrünem Mantel ein. Wir vermuten, daß die gelbgrünen Gewebe auf stofflicher Grundlage auf die Gewebe mit *Lamarckiana*-Plastiden einwirken. Es bleibt dann jedoch zu erklären, wie es kommt, daß ein derartiger Stoffaustausch offenbar bevorzugt in der senkrechten und nur selten in waagerechter Richtung stattfindet. Untersuchungen in dieser Hinsicht erscheinen uns lohnenswert. Berücksichtigt man, daß (wie aus noch nicht abgeschlossenen Kreuzungsversuchen mit verschiedenen nach „Weiß“ mutierten Plastidensorten hervorgeht) auch andere chlorophylldefekte Plastidenmutanten, nicht aber normal ergrünende Plastidensorten, den gleichen Einfluß auf die Entwicklung der *Lamarckiana*-Plastiden ausüben können, so gewinnt man den Eindruck, daß der Stoff kein für gelbgrüne *suaveolens*-Plastiden spezifischer ist. Der Einfluß besteht vielleicht lediglich darin, daß das Gewebe mit *Lamarckiana*-Plastiden an das gelbgrüne Gewebe bestimmte überschüssige Assimilate abgibt. Die Vorstellung, daß das mutiert gelbgrüne Gewebe der nehmende Partner sei, ist nicht mehr als eine Hypothese, die der Tatsache gerecht zu werden versucht, daß die *albivelutina* immer dann bleich ist, wenn die inneren und äußeren Bedingungen für eine reichliche Stoffüberproduktion günstig erscheinen. Experimente in dieser Richtung sind beabsichtigt.

Physiologisch-chemische Untersuchungen an Geweben, die wegen Plastomdifferenzen chlorophylldefekt sind, können vielleicht dazu beitragen, eine bessere Charakterisierung der

¹ Daß es Plasmaunterschiede zwischen *Oe. Lamarckiana* und *Oe. suaveolens* gibt, dürfen wir auf Grund eigener unveröffentlichter Untersuchungen über das *falcifolia*-Merkmal (HARTE 1948) annehmen.

verschiedenartigen Plastommutationen zu ermöglichen und damit die Biochemie des Plastoms der Analyse näherzubringen. Auf Grund züchterischer Erfahrungen können wir bereits zwischen zwei Kategorien von Mutationen unterscheiden, worauf hier kurz hingewiesen werden soll: Die verschiedenen Plastome, die sich in den Wildarten von *Oenothera* im Laufe der Stammesentwicklung auf dem Wege der Mutation (wie wir annehmen) herausdifferenziert haben, sind solange in der Lage, ihre Plastiden normal ergrünen zu lassen, wie sie mit einem ihnen entsprechenden Genom kombiniert sind. Chlorophylldefekte treten erst nach Bastardierung auf, und zwar nur dann, wenn das Plastom mit diesem Bastardgenom nicht harmoniert. Die Differenzierung der Wildarten-Plastome hat offenbar bewirkt, daß die Plastiden empfindlich geworden sind gegenüber bestimmten, für sie fremden Genomeinflüssen. Ein derartiger Genomeinfluß kann z. B. darin bestehen, daß der physiologische Zustand bzw. der Chemismus der Mesophyllzellen dauernd oder nur in gewissen Entwicklungsabschnitten der Pflanze so verändert worden ist, daß die Entwicklungsbedingungen für Chloroplasten der betreffenden Plastidensorte ungeeignet sind. Oder anders gesehen: Die Plastidensorte wird zum Indikator für einen bestimmten Zustand des sie umgebenden Zellmilieus, in dem sie sich entwickeln muß. Wir wollen diese Art von Mutationen einmal „Differenzierungsmutationen“ nennen. Ihnen stellen wir die „Defektmutationen“ gegenüber, wie wir sie in den chlorophylldefekten Mutanten der Wildartenplastome vor uns haben. Soweit bisher bekannt ist, sind bei *Oenothera* alle in Kultur aufgetretenen Plastommutanten, die sich als mehr oder weniger chlorophylldefekte Sektoren in normalerweise grüner Umgebung zu erkennen gaben, dadurch ausgezeichnet, daß für sie kein Genom zu finden ist, mit dem sie im Mesophyll wieder normal zu ergrünen vermögen¹. Man muß daher annehmen, daß hier durch die Mutation ein tiefgreifender, durch Anpassung seitens des Genoms nicht kompensierbarer Defekt entstanden ist.

Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Plastidensorten waren bei *Oenothera* bisher nicht beobachtet worden. Für *Epilobium* wurden von MICHAELIS (1957a) Fälle beschrieben, wo aus dem Fehlen von Mischzellen auf derartige Wechselwirkungen geschlossen werden kann. Es handelt sich dabei jedoch um Beispiele, die sich in verschiedener Hinsicht von dem hier an *Oe. albivelutina* analysierten Fall unterscheiden: 1. Im einen Falle (S. 410) bleibt die Plastomwirkung auf die Mischzelle beschränkt. In dieser bilden die beiden erblich verschiedenen Plastidensorten den gleichen Phänotyp aus, denn der eine dominiert über den anderen. 2. In anderen Fällen (S. 414) findet eine Wechselwirkung zwischen Geweben mit verschiedenen Plastidensorten statt, aber diese ist nicht richtungsgebunden. Man kann infolgedessen ein allmähliches Abflauen der Wirkung in der Transversalebene des Blattes beobachten. — Bei der dreifarbigigen *albivelutina* liegen die Verhältnisse günstigerweise so, daß das Zusammenwirken der beiden Plastome in einem dritten Phänotyp resultiert. Nur so war es möglich, auch die Richtungsgebundenheit des Einflusses sofort zu erkennen. Man kann sich an Hand dieses Modellfalles nun leicht überlegen, wie die Scheckungsmuster aussehen würden, wenn normalgrüne *suaveolens*-Plastiden in der *albivelutina* auf *Lamarckiana*-Plastiden dieselbe Wirkung ausüben würden wie die mutierten gelbgrünen: In Mischzellen und bei periklinaler Anordnung plastomverschiedener Gewebe würden sich die beiden Plastidensorten nicht unterscheiden lassen. In Sektoren mit einheitlichem Plastom würden sie jedoch phänotypisch verschieden sein und Scheckung ergeben. Bezüglich der Beurteilung des Scheckungsgrades usw. würde man leicht zu Fehlschlüssen kommen. Man wird deshalb in Zukunft

¹ Die Ergrünungsfähigkeit der kleinen Epidermischloroplasten bleibt von dieser Mutation unberührt; auch die Plastiden der Schließzellen ergrünen bei den Defektmutanten noch normal. Daneben ist die Empfindlichkeit gegenüber gewissen Genomen (der „Disharmonie-Effekt“) durch die Mutation nicht verändert worden. So z. B. können durch Mutation gelbgrüne Plastiden durch Genomeinfluß noch weiß werden.

bei der Auswertung von Scheckungsmustern derartige Fehlermöglichkeiten beachten müssen. Glücklicherweise lassen sich dafür bei *Oenothera* leichter als bei anderen Objekten gescheckte Bastarde auf dem Wege der Kreuzung in größerem Umfang herstellen und beliebig oft reproduzieren.

Summary

The true-breeding hybrid *Oenothera albivelutina* (*albicans* · *velans*) obtained by crossing *Oe. suaveolens* × *Oe. Lamarckiana* is often variegated by plastids from the father: The *suaveolens*-plastids become green normally, while the *Lamarckiana*-plastids become pale regionally in particular developmental stages. It is possible to replace the normal *suaveolens*-plastids by mutated chlorophyll-deficient (yellow-green) plastids. In the regions where the *Lamarckiana*-plastids are getting pale we then observe, not only the expected variegation pale/yellow-green, but in addition normally green tissue too.

Genetic analysis shows, that the green tissue does not represent a new idio-type, but its plastids are *Lamarckiana*-plastids which have become green (instead of being pale) by the influence of neighbouring mutated yellow-green *suaveolens*-plastids. The investigation of cross-sections through the leaves shows, that the *Lamarckiana*-plastids become green only when cells with mutated plastids lie above or below them, but not when situated beside them in the same layer. In the latter case the *Lamarckiana*-plastids are pale. In the entire leaf this inter-cellular effect of yellow-green plastids on *Lamarckiana*-plastids is limited to the vertical direction. Only by exception cells in the same layer influence one another. It is assumed that this corresponds to a preferential transport of metabolites in the vertical direction.

Literatur

BARTELS, F.: Ungewöhnlich große Chloroplasten bei *Epilobium*-Bastarden. Protoplasma (Wien) **48**, 398 (1957). — CORRENS, C.: Vererbungsversuche mit buntblättrigen Sippen. II. S.-B. preuß. Akad. Wiss. **44**, 820 (1919). — HARTE, C.: Zytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden *Oenothera*-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 495 (1948). — KAPPUS, A.: Wilde *Oenotheren* in Südwestdeutschland. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 38 (1957). — MICHAELIS, P.: Über die Vererbung von Plastidenmerkmalen. Protoplasma (Wien) **48**, 403 (1957a). — Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. Planta (Berl.) **50**, 60 (1957b). — RENNER, O.: Die äußeren Samen der *Oenotheren*. Ber. dtsh. bot. Ges. **36**, 172 (1916). — Versuche über die gametische Konstitution der *Oenotheren*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **18**, 121 (1917). — Eiplasma und Pollenschlauchplasma als Vererbungsträger bei den *Oenotheren*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **27**, 235 (1922). — Die Scheckung der *Oenotheren*-Bastarde. Biol. Zbl. **44**, 309 (1924). — Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **130**, 218 (1936a). — Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter und rein grüner Blätter von *Sambucus*, *Veronica*, *Pelargonium*, *Spiraea*, *Chlorophytum*. Flora (Jena) **130**, 454 (1936b). — Plastidenvererbung bei *Oenothera*. Bayer. Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl., Sitzg. v. 2. Mai 1952. — SCHÖTZ, F.: Über Plastidenkonkurrenz bei *Oenothera*. Planta (Berl.) **43**, 182 (1954). — STUBBE, W.: Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 80 (1953). — Erbliche Chlorophylldefekte bei *Oenothera*. Photographie u. Wissenschaft **4**, 3 (1955). — Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera* I. Ber. dtsh. bot. Ges. **70**, 221 (1957).

Dr. WILFRIED STUBBE, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstraße 17

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER ABREGULIERUNGSVORGÄNGE BEI KÜNSTLICH HERGESTELLTEN HOCHPOLYPLOIDEN PFLANZEN

Von

WERNER GOTTSCHALK

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. November 1957)

A. Einleitung

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde über meiotische und prämeiotische Abregulierungserscheinungen bei einer autotetraploiden Tomate berichtet (GOTTSCHALK 1957). Im Verlauf dieser Vorgänge kam es bei der betreffenden Versuchspflanze in geringem Umfang zur Bildung haploider Keimzellen, durch deren gegenseitige Befruchtung diploide Organismen entstehen könnten. Damit war zumindest theoretisch eine cytologische Erklärung für das seit Jahren bekannte, aber bisher noch nicht geklärte Phänomen der Herabregulierung der Chromosomenzahl in künstlich hergestellten polyploiden Pflanzen gegeben. Die publizierten Befunde waren — von geringen Ausnahmen abgesehen — an einer einzigen Versuchspflanze erarbeitet worden, und es mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß es sich hierbei um einmalige, auf die betreffende Pflanze beschränkte anormale cytologische Verhältnisse handelte, die nicht ohne weiteres für die generelle Erklärung des Abregulierungsphänomens herangezogen werden können. Es war daher unser Bestreben, derartige Untersuchungen auf eine größere Anzahl von Versuchspflanzen auszudehnen und festzustellen, ob die bisher beobachteten Erscheinungen auch bei anderen autopolyploiden Pflanzen auftreten und daher verallgemeinert werden können. Wir haben diese Frage sowohl an tetraploiden als auch an höherpolyploiden Pflanzen bearbeitet und haben dabei die bereits publizierten Befunde bestätigen und erweitern können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit seien zunächst Abregulierungsvorgänge besprochen, die an 4 *oktoploiden* Tomaten gefunden wurden. Hinsichtlich der Literatur kann dabei auf die Zitierungen in meiner früheren Publikation verwiesen werden, das gleiche gilt für die methodischen Einzelheiten bei der Herstellung der polyploiden Versuchspflanzen.

B. Material und Methode

Es wurden Samen tetraploider Tomaten der Handelssorte „Immun“ auf Colchicin-Agar nach SWAMINATHAN (1950) angekeimt und die Pflanzen anschließend im Gewächshaus aufgezogen. Im Verlauf dreijähriger Versuche wurden mit Hilfe dieser Methode insgesamt 12 rein oder hypooktoploide Pflanzen erhalten. Einige dieser Versuchspflanzen traten in die Anthese ein und bildeten so viele Knospen, daß eine cytologische Bearbeitung der Meiosis möglich war. Hierzu wurden die jungen Antheren in Carnoy 3:1 fixiert, mit Karmin-Essigsäure unter Eisenzusatz gefärbt und als Quetschpräparate verarbeitet.

C. Die empirischen Befunde

Die haploide Chromosomenzahl von *Lycopersicon esculentum* beträgt $n=12$; in oktaploiden Pollenmutterzellen (PMZ) müßten also 4 tetraploide Gonen mit je

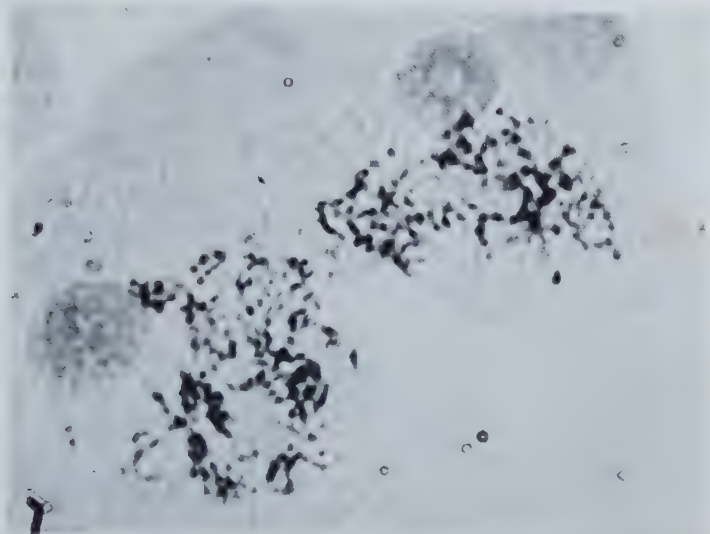


Abb. 1. Zwei getrennte Kerne im Pachytän einer PMZ der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 75 (1200fach)

48 Chromosomen gebildet werden. Das war in der Mehrzahl der Gonotokonten der bearbeiteten oktaploiden Tomaten auch der Fall. Daneben traten jedoch in geringer Häufigkeit abweichende meiotische Teilungszyklen auf, in deren Verlauf Gonen mit der abregulierten diploiden Chromosomenzahl von $n=24$ gebildet wurden. In den betreffenden PMZ waren bereits in der frühen Prophase 2 völlig getrennte Kerne zu beobachten, die den gesamten meiotischen Stadienablauf unabhängig voneinander durchliefen. Als frühestes Stadium dieses Abregulierungsmotus wurden Zygotänkerne gefunden; in den Abb. 1—3 sind Pachytän- und Diplotänkerne wiedergegeben. In der Mehrzahl derartiger

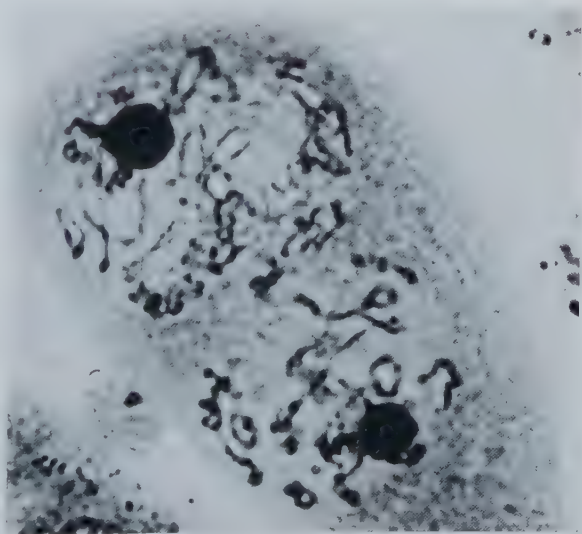


Abb. 2. Zweikernige PMZ der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 75. Der obere Kern durchläuft ein Übergangsstadium vom Diplotän zur frühen Diakinese, der untere Kern befindet sich in der frühen Diakinese (1200fach)

Gonotokonten waren die Chromosomenzahlen in den beiden Kernen anscheinend gleich groß. Leider trat das Phänomen im bearbeiteten Material so selten auf, daß

eine quantitative Auswertung der Diakinese-Kerne nicht möglich war. Die Frage, ob die beiden Teilkkerne mit Sicherheit jeweils 4 komplette Genome enthielten, läßt sich also nicht entscheiden. Es wurden jedoch im Pachytän und in der Diakinese — soweit überhaupt einigermaßen übersichtliche mikroskopische Bilder vorhanden waren — in allen Fällen 4 Satellitenchromosomen je Kern beobachtet. Es kann somit angenommen werden, daß in den fraglichen Zellen offenbar bereits vor Beginn der Meiosis nicht ein oktoploider, sondern 2 tetraploide Kerne vorhanden waren. Die Meiosis verlief in den beiden Kernen meist synchron, gelegentlich wurden jedoch geringe Unterschiede im Stadienablauf beobachtet. So durch-



Abb. 3. Zweikernige hypo-oktoploide PMZ. Beide Kerne durchlaufen die mittlere Diakinese (Versuchspflanze Nr. 75, 1000fach)

läuft in der in Abb. 2 wiedergegebenen PMZ der untere Kern die frühe Diakinese, während sich die Chromosomen des oberen Kernels noch in einem Übergangsstadium zwischen Diplotän und Diakinese befinden. Diese Unterschiede deuten an, daß die beiden Kerne einen gewissen Grad gegenseitiger Unabhängigkeit erreicht haben.

In der 1. Metaphase dieser PMZ treten 2 getrennte Äquatorialplatten mit eigenen Spindeln auf (Abb. 4). Als Folge davon werden bereits gegen Ende der 1. meiotischen Teilung 4 Kerne mit je der diploiden Chromosomenzahl gebildet. Die in Abb. 5 dargestellte PMZ durchläuft nicht die zweite, sondern die spätere erste meiotische Teilung. Die würfelförmige Form der Chromosomen ist bei *Lycopersicon esculentum* charakteristisch für T I, während die Chromatiden der 2. Telophase kleiner und mehr kugelförmig sind. Alle benachbarten PMZ aus der gleichen Antherenregion durchliefen ebenfalls die Stadien M I, A I und T I. Die Chromosomenzahlen der beiden Zellhälften stimmen nicht ganz überein; die beiden linken Kerne besitzen je 25 Chromosomen, rechts sind es — ohne Berücksichtigung der Nachzügler — 17—18 Chromosomen je Kern. Diese Unregelmäßigkeiten sind offenbar bei der Trennung der ursprünglich vorhandenen 8 Genome in 2 Partien zu je 4 Genomen zu Beginn des Abregulierungsvorgangs zustande gekommen. Die Gesamtchromosomenzahl dieses Gonotokonten liegt

etwas unter der oktoploiden Valenz, eine Erscheinung, die bei der Versuchspflanze Nr. 75 häufiger beobachtet wurde.

In der 2. Metaphase dieser PMZ treten statt zwei Äquatorialplatten vier auf. Sie besitzen eigene Spindeln, in denen eine normale Anaphasenwanderung der Chromosomen abläuft (Abb. 6a u. b; die in dieser Abbildung dargestellte PMZ war bei Verwendung der Ölimersion größer als das Blickfeld des Mikroskops, es mußten daher 2 Mikrophotos angefertigt werden). Auch hier entspricht die Chromosomenzahl der 4 Äquatorialplatten nicht genau dem balancierten Zustand von $4 \times 2n$, es sind vielmehr 2 leicht hyper- und 2 leicht hypodiploide Platten vorhanden. Im weiteren Verlauf der Meiosis werden in derartigen Gonotokonten nicht 4 tetraploide, sondern 8 diploide Gonen gebildet (Abb. 7).

Die hohe Chromosomenzahl und die dichte Lagerung der Chromosomen bringen es mit sich, daß genaue Chromosomenzählungen in der 2. Telophase nur selten durchführbar sind. Außerdem war die Zahl der PMZ, die diesen abweichenden Teilungszyklus durchliefen, verhältnismäßig gering. In den analysierbaren Zellen lag die Chromosomenzahl der Gonen meist bei 24 oder wich nur geringfügig von der diploiden Valenz ab. Größere Abweichungen wurden nur selten gefunden. In einem Gonotokonten waren 4 Gonen mit je 18 und 4 Gonen mit je 28 Chromosomen vorhanden. Etwas spätere Stadien — also Übergangsstadien von der 2. Telo- zur 2. Interphase — traten häufiger auf. In nahezu allen Fällen waren die 8 Tochterkerne etwa gleich groß. Es kann somit angenommen werden, daß die Bildung von 8 diploiden Gonen in derartigen oktoploiden PMZ generell angestrebt, aber nicht in allen Fällen exakt erreicht wird. Auf die Ursachen der auftretenden Unregelmäßigkeiten wird im theoretischen Teil der Arbeit eingegangen.



Abb. 4. Zwei Äquatorialplatten in der 1. Metaphase der oktoploiden Pflanze Nr. 75 (1200fach)

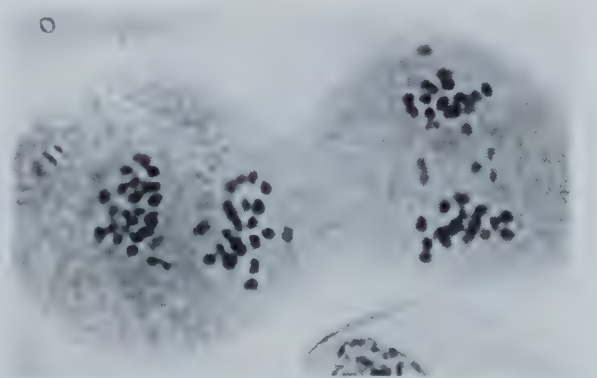


Abb. 5. 1. Telophase einer abregulierenden oktoploiden PMZ mit 4 Tochterkernen (1000fach)



Abb. 6a u. b. 2. Metaphase einer abregulierenden oktoploiden PMZ mit 4 Äquatorialplatten und 4 Spindeln. Die Zelle war so groß, daß 2 Mikrophotos davon angefertigt werden mußten. Die beiden Photos überlappen sich in der Region der mittleren beiden Platten (1200fach)

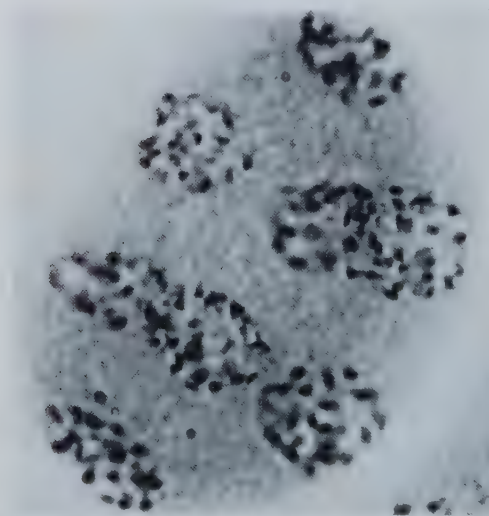


Abb. 7



Abb. 8

In einer kürzlich publizierten Arbeit über meiotische Abregulierungsvorgänge bei autotetraploiden Pflanzen (GOTTSCHALK 1957) habe ich bereits auf ähnliche Vorgänge hingewiesen, es war mir anhand des damals verfügbaren Materials jedoch nicht möglich, festzustellen, ob es sich hierbei um einen echten Regulierungsmodus handelt, weil ich nur über Stadien verfügte, in denen keine Chromosomenzählungen möglich waren. Inzwischen haben wir bei der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 1412 meiotische Stadien gefunden, die den eben geschilderten Verhältnissen bei oktoploiden Tomaten entsprechen. In Abb. 8 ist eine 2. Metaphase dieser Pflanze mit 4 haploiden Äquatorialplatten dargestellt; die beiden rechten Platten überdecken sich etwas. In derartigen Gonotokonten entstehen 8 haploide Gonen (Abb. 9).

Abb. 7. Acht diploide Gonen einer PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 75 (1000fach)

Abb. 8. 2. Metaphase einer abregulierenden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 1412. Es sind 4 Äquatorialplatten mit eigenen Spindeln vorhanden. Die beiden rechten Platten liegen in der Berührungszone etwas übereinander (1200fach)

Der eben geschilderte Abregulierungsmodus ist dadurch charakterisiert, daß die in der Archesporozelle ursprünglich vorhandenen 8 Chromosomensätze in einem noch nicht genau bekannten Entwicklungsstadium der Anthere offenbar in 2 Partien zu je 4 Genomen zerlegt werden. Es besteht nun auch die Möglichkeit, daß eine Trennung der 8 Genome in $2+6$ Sätze zustande kommt. Derartige Vorgänge wurden in der Diakinese einiger hochpolyploider Versuchspflanzen beobachtet und waren im verarbeiteten Material wahrscheinlich auch schon in früheren meiotischen Stadien vorhanden, konnten jedoch nicht exakt erfaßt werden, weil sich die Chromosomenzahlen nicht ermitteln ließen. In der 1. Metaphase derartiger Gonotokonten werden ebenfalls 2 Äquatorialplatten mit eigenen Spindeln auftreten. In der in Abb. 10 dargestellten PMZ ist deutlich erkennbar,



Abb. 9

Abb. 9. 2. Telophase einer abregulierenden tetraploiden PMZ mit 8 haploiden Kernen (Versuchspflanze Nr. 16, 900fach)

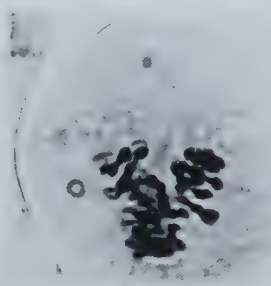


Abb. 10

Abb. 10. 1. Metaphase einer PMZ der hypo-oktoploiden Pflanze Nr. 11. Es sind 2 Äquatorialplatten mit sehr unterschiedlichen Chromosomenzahlen vorhanden (1000fach)

daß es sich hierbei wirklich um eine MI handelt, denn es sind Bivalente bzw. Multivalente vorhanden. Ihre Anzahl liegt in der rechten Platte bei etwa 12, in der linken Platte war sie nicht genau feststellbar, lag jedoch über 30. Es besteht wohl kein Zweifel, daß hier im Prinzip die Anordnung von $24+72$ Chromosomen, also von $2n+6n$, vorliegt. In der 1. Telophase werden ebenfalls 4 Kerne, und zwar im Idealfall 2 haploide und 2 triploide, gebildet werden. Dieses Stadium wie auch die 2. Metaphase konnten im bearbeiteten Material nicht gefunden werden. Es war jedoch eine T II vorhanden, aus der sich erkennen läßt, daß der meiotische Stadienablauf in derartigen Gonotokonten normal weiterläuft. Die betreffende PMZ enthielt 8 Kerne, und zwar 2 Gruppen zu je 4 Kernen mit sehr unterschiedlichen Chromosomenzahlen. Die 4 niedrigchromosomigen Kerne besaßen je 10 bzw. 11 Chromosomen, in den anderen 4 Kernen ließ sich die Chromosomenzahl wiederum nicht genau ermitteln, sie lag jedoch höher als 30 und war in allen 4 Kernen wohl gleich groß. Leider ist die Zelle nicht gut gequetscht worden, so daß die 8 Kerne in verschiedenen optischen Ebenen liegen. Trotzdem lassen sich die eben geschilderten Verhältnisse im Mikrophoto erkennen.

Nach Abschluß der Meiosis werden hier also 8 Gonen — und zwar im Prinzip 4 haploide und 4 triploide — vorhanden sein (Abb. 12). Es sei auch hier wieder erwähnt, daß die angestrebte Trennung der oktoploiden Chromosomenzahl in $2n + 6n$ nicht in allen Fällen erreicht wurde. Die Abweichungen waren hier größer als beim eben beschriebenen Teilungszyklus. So wurde z. B. statt $24 + 72$ Chromosomen in 2 Diakinesezellen übereinstimmend eine Trennung in etwa $37 + 58$ Chromosomen beobachtet.

Schließlich sei noch ein Befund angeführt, der mit großer Wahrscheinlichkeit in die gleiche Gruppe von Regulierungsvorgängen gehört. Es handelt sich um die 1. Metaphase einer PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 75, in der 3 von-

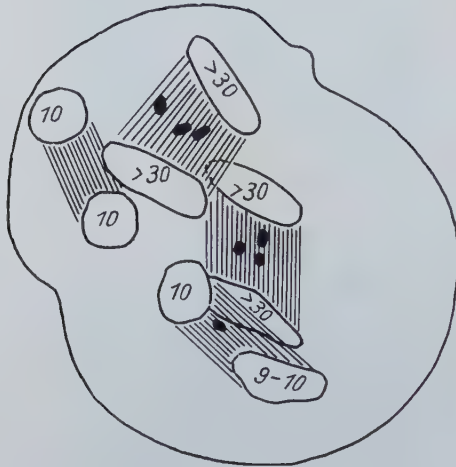


Abb. 11. Abregulierende PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 4 in der 2. Telophase. Die Chromosomenzahlen der 8 Kerne entsprechen etwa den Valenzen von $n + n + n + n + 3n + 3n + 3n + 3n$ (1000fach)

einander unabhängige Äquatorialplatten vorhanden sind (Abb. 13). Offenbar liegt auch hier keine zufällige Erscheinung vor; die Chromosomenzahlen der 3 Partien lassen vielmehr auf eine gewisse Gesetzmäßigkeit schließen. In der rechten Platte sind 11—12 Bivalente vorhanden, die linke Platte besteht aus 3 Partien mit $3 + (4-5) + 4$ Gemini, das sind also wiederum 11—12 Bivalente. Die mittlere Platte schließlich enthält mehr als 20 Bi- bzw. Multivalente. Die Chromosomenzahlen in den 3 Platten entsprechen also den Valenzen $2n + 2n + 4n$. Es hat somit den Anschein, als sei in dieser oktoploiden PMZ oder in einer prämeiotischen Zelle, aus der sie hervorgegangen ist, eine Genomsonderung nach dem Schema $2n + 2n + 4n$ abgelaufen. Läuft die Meiosis in diesem Gonotokonten normal weiter, so werden bereits gegen Ende der 1. meiotischen Teilung 6 Kerne — und zwar 2 diploide und 4 haploide — entstehen. Nach Abschluß der Meiosis sind folglich 4 diploide und 8 haploide Gonen vorhanden. Leider konnten die anderen Stadien dieses Regulierungsmodus noch nicht gefunden werden. In der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 18 traten jedoch PMZ auf, die das Stadium des frühen Pachytäns durchliefen und in denen 3 selbständige Kerne vorhanden waren (Abb. 14). Chromosomenzählungen lassen sich in diesem Stadium nicht vornehmen, aus dem Mikrophoto läßt sich aber erkennen, daß die rechten beiden

Kerne der Zelle etwa gleich groß sind und hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl übereinstimmen könnten. Der linke Kern ist größer und besitzt wesentlich mehr Chromosomen. Es wäre durchaus möglich, daß sich die Chromosomenzahlen in den 3 Kernen wie 2:1:1 verhalten, daß also eine Sonderung der 4 vorhandenen Genome in 3 Teilkernen mit den Valenzen $2n + n + n$ zustande gekommen ist. In einer tetraploiden Zelle ist dieser Vorgang für die Abregulierung ohne Bedeutung, denn es sind bereits in der 1. meiotischen Metaphase haploide Kerne vorhanden, die im Verlauf der Meiosis nur noch zahlenmäßig, nicht aber genomatisch weiter reduziert werden können. Im Prinzip entspricht der beobachtete Vorgang jedoch der Genomsonderung von $4n + 2n + 2n$ in der Prophase einer oktaploiden PMZ.

In Abb. 15 sind die 3 besprochenen abweichenden meiotischen Teilungszyklen schematisch dargestellt. Es sei noch erwähnt, daß die früher publizierten Abregulierungsvorgänge inzwischen auch an anderen autotetra- und -oktaploiden Versuchspflanzen aufgefunden wurden. Es kann somit angenommen werden, daß die beschriebenen Vorgänge von allgemeiner Gültigkeit sind. Wir haben ähnliche Untersuchungen an polyploiden Organismen anderer Gattungen und Familien vorbereitet, um die Verbreitung dieser Phänomene zu studieren.



Abb. 12. 2. Telophase einer PMZ der oktaploiden Pflanze Nr. 75 mit 4 hoch- und 4 niedrig-chromosomigen Kernen (1200fach)

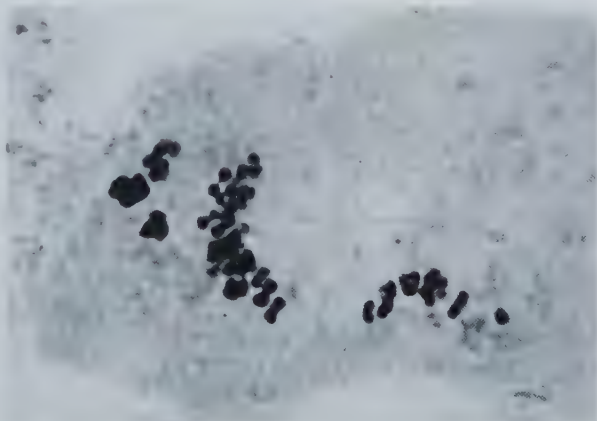


Abb. 13. 1. Metaphase einer PMZ der oktaploiden Pflanze Nr. 75. Es sind 3 getrennte Äquatorialplatten vorhanden. Ihre Chromosomenzahlen entsprechen den Valenzen von $2n + 4n + 2n$ (1200fach)

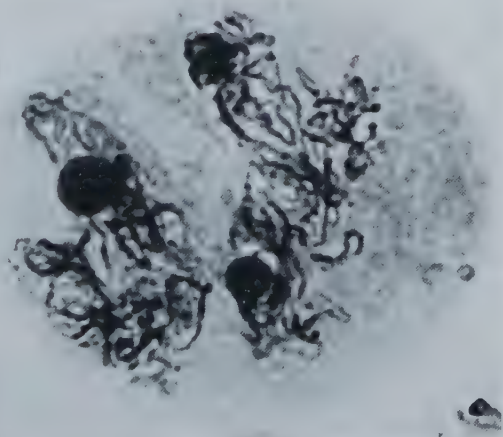


Abb. 14. PMZ der tetraploiden Pflanze Nr. 18 mit 3 selbständigen Kernen im Pachytän (1200fach)

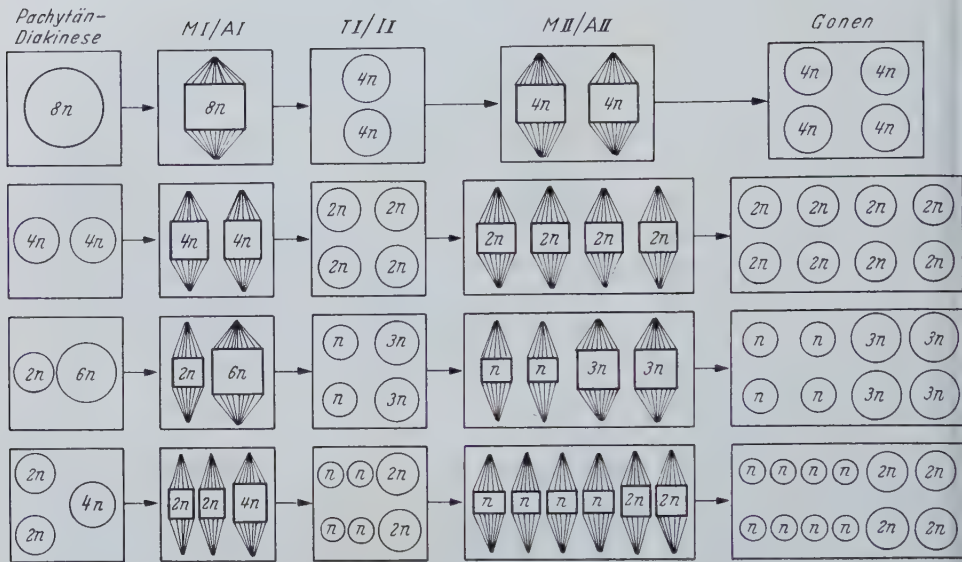


Abb. 15.. Schematische Darstellung der in den oktaploiden Versuchspflanzen Nr. 4, 11, 16 und 75 gefundenen abweichenden meiotischen Teilungszyklen (obere Reihe: Normalverlauf)

D. Besprechung der Ergebnisse

Bei der Bearbeitung des Phänomens der Abregulierung an autotetraploiden Tomaten (GOTTSCHALK 1957) waren im wesentlichen 2 verschiedenartige Regulierungsmodi gefunden worden, nämlich die Verteilung von $n + 3n$ in der 1. meiotischen Telophase und die Kombination von $2n + n + n$ in T I bzw. M II. Ich habe damals bereits darauf hingewiesen, daß der letztgenannte Modus möglicherweise mit einer Aufteilung des Kerns in selbständige Genome vor der Bildung der ersten Äquatorialplatte — also im Verlauf der meiotischen Prophase oder noch früher — verbunden ist, es war damals jedoch nicht möglich, diese Hypothese durch eindeutige mikroskopische Befunde zu stützen. Diese Befunde konnten jetzt an einem verwandten Regulierungsmodus in einer oktaploiden Pflanze erbracht werden; es waren PMZ vorhanden, die in allen Stadien der meiotischen Prophase 2 oder sogar 3 getrennte, selbständige Kerne enthielten. In jedem der Kerne lief die Meiosis normal weiter. Als Ergebnis dieser Vorgänge werden in den betreffenden PMZ Gonen mit abregulierten Chromosomenzahlen gebildet.

Diese meiotischen Befunde an autopolyploiden Organismen stellen eine auffallende Parallele zu ähnlichen Vorgängen dar, die unter der Bezeichnung der Bildung von „reductional groupings“ an diploiden und polyploiden Mitosen von Wurzelspitzen sowie in der Rattenleber beobachtet worden sind (Literatur bei GOTTSCHALK 1957). Im Verlauf dieser Vorgänge treten in der mitotischen Prophase 2 getrennte Chromosomenpartien auf. In beiden Kernen läuft die Mitose normal zu Ende, es entstehen folglich nicht 2, sondern 4 Telophasenkerne, die häufiger, als es nach Zufallsgesetzen zu erwarten wäre, die gleiche — und zwar die reduzierte — Chromosomenzahl besitzen. Es ist also eine somatische Reduktion zustande gekommen.

Wenn wir diese Befunde auf die *prämeiotischen Mitosen polyploider Organismen* übertragen, so rundet sich das Bild, und es läßt sich folgende Arbeitshypothese aufstellen (vgl. Schemazeichnung Abb. 16): Die Bildung von reductional groupings führt — unter der Voraussetzung, daß sie mit einer echten Genomsonderung verbunden ist — in den meristematischen tetraploiden Archesporzellen zu zwei diploiden Kernen. Damit ist eine erste Reduktion der Chromosomenzahl erfolgt. Es ist gewissermaßen einer der 3 Effekte der Meiosis zeitlich verfrüht abgelaufen. Wenn nun nach Beendigung der Mitose in einer derartigen Zelle wie nach einer normalen Mitose nur eine Membran gebildet wird, so werden im Verlauf weiterer

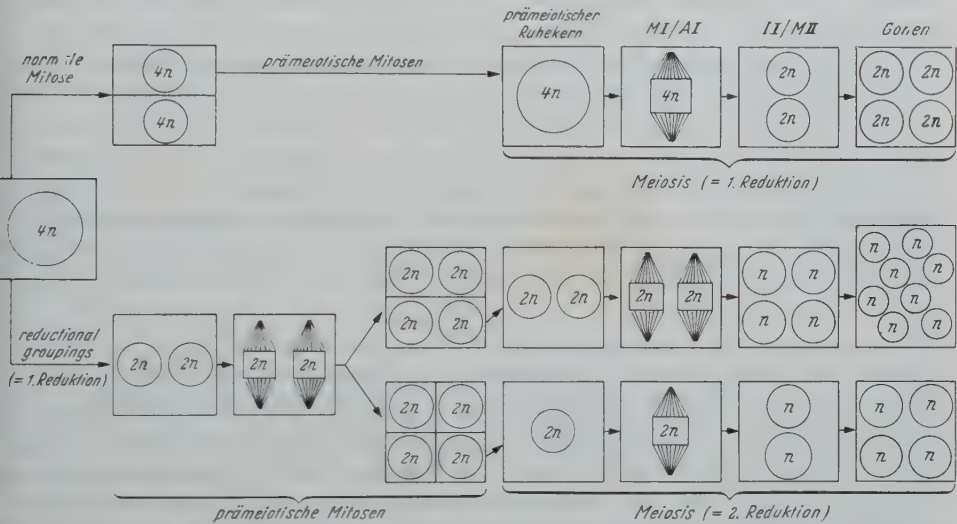


Abb. 16. Schematische Gegenüberstellung der normalen cytologischen Verhältnisse (oben) und der Kombination von prämeiotischer und meiotischer Reduktion in einer tetraploiden Anthere (unten): Erläuterung im Text

prämeiotischer Mitosen zweikernige Tochterzellen und schließlich 2 prämeiotische Ruhekerne je Archesporzelle entstehen (Abb. 16, Mitte). Alles Weitere ist empirisch belegt: Die beiden Kerne einer derartigen Archesporzelle durchlaufen unabhängig voneinander die Meiosis. In der 1. meiotischen Anaphase kommt es in beiden Kernen zur üblichen Reduktion der Chromosomenzahl, die jedoch in den fraglichen Zellen bereits die 2. Reduktion darstellt. Es sind somit bereits nach der 1. meiotischen Teilung 4 haploide Kerne vorhanden, aus denen auf dem Wege einer normalen 2. meiotischen Teilung 8 haploide Gonen entstehen.

Diese Deutung gilt im Prinzip auch für oktoploide Pflanzen, und zwar für alle 3 in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Regulierungsmodi. Bei den unteren beiden Teilungszyklen der Abb. 15 muß lediglich die zusätzliche Annahme gemacht werden, daß die erste Genomsonderung nicht zu 2 gleichen Partien aus 2×4 Genomen, sondern zu ungleichen Partien aus $2 + 6$ - bzw. $2 + 2 + 4$ Chromosomensätzen führt. Ganz entsprechende Befunde haben SUOMALAINEN (1940) in der Metaphase der Reifeteilung polyploider parthenogenetischer Rüsselkäfer sowie GLÄSS (1956) in der Metaphase polyploider Mitosen

der Rattenleber erhalten. *Das Zustandekommen haploider und diploider Keimzellen in einem oktoploiden Organismus ist also im vorliegenden Falle durch die Kombinierung einer prämeiotischen und der normalen meiotischen Reduktion ohne Schwierigkeit erklärbar.*

Es wäre nun auch denkbar, daß in einer tetraploiden, 2-kernigen prämeiotischen Zelle nach Abschluß der Mitose nicht zwei 2-kernige, sondern vier 1-kernige Tochterzellen entstehen (Abb. 16, unten). Es wird dies ausschließlich von der Membranbildung nach Beendigung der Mitose abhängen. Im letzteren Falle werden im Verlauf weiterer prämeiotischer Mitosen normale einkernige, aber *diploide*, also reduzierte Archespor- und Pollenmutterzellen entstehen, in denen nach Ablauf einer normalen Meiosis 4 haploide Gonien gebildet werden. Wir haben sowohl bei tetraploiden als auch bei oktoploiden Versuchspflanzen immer wieder PMZ mit der reduzierten Chromosomenzahl gefunden, haben jedoch keine einleuchtende Erklärung für ihre Entstehung geben können. Mit Hilfe der eben abgeleiteten Arbeitshypothese sind die erhaltenen Befunde leicht zu deuten.

Der entscheidende Vorgang der prämeiotischen Abregulierung ist die Aufgliederung der in einer polyploiden Zelle vorhandenen Chromosomen in funktionell selbständige Genome. Über die Mechanik dieses Vorgangs können noch keine empirisch belegten Angaben gemacht werden. Die prämeiotische Reduktion muß jedoch so ablaufen, daß komplette Chromosomensätze übrigbleiben. Diese Forderung wird noch am ehesten durch die Annahme erklärbar, daß es im Verlauf der mitotischen Prophase in derartigen Zellen zur Bildung von Bivalenten kommt, und daß in der Anaphase nicht Spalthälften, sondern ganze Chromosomen an die Pole wandern. Eine derartige Mitose würde aber der ersten meiotischen Teilung entsprechen. Wenn im Anschluß an diesen Vorgang die Membranbildung unterbleibt, so ist eine Zelle mit 2 *reduzierten und einregulierten* Kernen entstanden. Nach Ablauf weiterer Mitosen mit normaler Zellwandbildung wird dieser Zustand immer wieder reproduziert werden. In der 1. meiotischen Teilung kann dann die zweite Reduktion störungsfrei erfolgen, weil in den beiden diploiden Teilkernen einer derartigen tetraploiden PMZ eine normale Bivalentenbildung zustande kommen kann. Im Prinzip müßten also Vorgänge ablaufen, die etwa den „Reduktionsmitosen“ entsprechen, die STEIN (1936) für eine Mutante von *Antirrhinum* beschreibt.

Bei dieser Interpretation wären auch die Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenzahl erklärbar, die im Zusammenhang mit der Abregulierung häufig zu beobachten sind, und die dafür sorgen, daß die entstehenden Gonien nicht immer exakt die haploide oder diploide Chromosomenzahl besitzen. In den polyploiden Ausgangskernen, die der oben formulierten Hypothese zufolge vorzeitig in eine meioseähnliche Teilung eintreten, werden nicht nur Bivalente, sondern auch Multi- und Univalente gebildet werden. Bei der Chromosomenverteilung im Rahmen der prämeiotischen Reduktion sind also Störungen zu erwarten, die gegen Ende der Meiosis zwangsläufig als Schwankungen in der Chromosomenzahl der abregulierten Gonien in Erscheinung treten müssen.

Über den Zeitpunkt der Genomsonderung können noch keine endgültigen Angaben gemacht werden. Im Pachytän und den späteren Stadien der meiotischen Prophase wurden des öfteren 2-kernige PMZ, vereinzelt auch 3-kernige Zellen gefunden. In prämeiotischen Ruhekernen konnte dieses Phänomen nur ein einziges Mal mit Sicherheit erfaßt werden. Die in der Meiosis beobachteten Erscheinungen entsprechen meines Erachtens völlig den reductional groupings der Wurzelspitzen-Mitosen und dürften mit großer Wahrscheinlichkeit im Verlauf der prämeiotischen Mitosen zustande gekommen sein. Leider waren diese frühen Stadien der Antherenentwicklung für die cytologische Auswertung nicht verfügbar.

Zusammenfassung

1. Es werden 3 verschiedenartige abweichende meiotische Teilungszyklen aus Pollenmutterzellen experimentell erzeugter oktaploider Tomaten beschrieben. Das Charakteristikum dieser Vorgänge liegt darin, daß bereits in der meiotischen Prophase 2 bzw. 3 selbständige Kerne je Zelle vorhanden sind, in denen eine normale Meiosis abläuft. Als Folge davon werden nach Beendigung der Meiosis Gonen mit der abregulierten haploiden und diploiden Chromosomenzahl gebildet.

2. Das Zustandekommen der abregulierten Keimzellen wird im vorliegenden Fall durch die Kombinierung einer prämeiotischen und der normalen meiotischen Reduktion erreicht.

3. Die an einer autotetraploiden Tomate früher beobachteten meiotischen Abregulierungsvorgänge konnten an mehreren anderen autopolyploiden Versuchspflanzen bestätigt werden und können damit als allgemeingültig angesehen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Professor Dr. ULLRICH bin ich für sein verständnisvolles Entgegenkommen sehr zu Dank verpflichtet. Desgleichen möchte ich meiner Mitarbeiterin, Fräulein Dr. N. PETERS, sowie Herrn Gartenmeister KAWALETZ für ihre unermüdliche Hilfe bei der Erzeugung und der mühevollen Aufzucht der hochpolyploiden Versuchspflanzen danken.

Literatur

BAUER, H.: Chromosomenforschung. Fortschr. Zool. **7**, 256—287 (1941). — GLÄSS, E.: Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenlebern. Chromosoma (Berl.) **8**, 468—492 (1956). — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen zum Problem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen. Z. Vererbungslehre **1957** (im Druck). — STEIN, E.: Die Doppelchromosomen im Blütenbezirk der durch Radiumbestrahlung erzeugten Mutante „cancroidea“ von *Antirrhinum majus*. Z. Vererbungslehre **72**, 267—286 (1936). — SUOMALAINEN, E.: Beiträge zur Cytologie der parthenogenetischen Insekten. I. *Coleoptera*. Ann. Acad. Sci. fenn. A **54**, 7—143 (1940). Zit. nach BAUER 1941. — SWAMINATHAN, M. S.: Einige Verfahren für die Verwendung wilder *Solanum*-Arten zu Zuchtzwecken. Züchter **20**, 358—360 (1950).

Dozent Dr. W. GOTTSCHALK, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn a. Rhein, Meckenheimer Allee 176

Biological Institute, Kyoto Prefectural Medical College, Kyoto

SPECIFICITY OF INTERACTIONS BETWEEN THE INDIVIDUAL GENE LOCUS AND THE STRUCTURE OF CHEMICAL MUTAGENS

By

YOSHIO NAKAO, YATARO TAZIMA* and YOSHIO SAKURAI**

(Eingegangen am 6. März 1957)

The possibility that chemical mutagens may act specifically on certain chromosome loci is of great interest. In the following, we are reporting data which indicate a specific relationship between individual gene loci and two related agents of the mustard group.

Material and Methods

The experiments made use of egg colour mutants which have already been utilized repeatedly (TAZIMA 1947, NAKAO 1953). In the silkworm, genes which control similar characters tend to occur on the same chromosome. Thus, *pe* and *re* are located on chromosome V at 0.0 and 31.7, and both of them control the colour of the egg (and also the colour of the eye). Whereas the normal colour is black, *pe/pe* eggs are white and *re/re* eggs, red. Eggs homozygous for both *pe* and *re* are also white.

Two mutagenic mustards, methyl-bis- β -chloroethyl-amine N-oxide (nitromine) and N-bis- β -chloroethyl-alanine (N. M.-alanine)¹ were used (Table 1). Since the two mustards have different LD₅₀, MTD (maximum tolerated dose) and MED (maximum efficient dose) as shown in Table 1 (ISHIDATE, SAKURAI, YOSHIDA and others 1954a, b), we used a 1/3 % solution of nitromine and a 1/20 % solution of N. M.-alanine. 0.05 ml of either solution were injected into the abdomen of male wild moths, and 20 minutes after the injection these moths were

Table 1. Chemical structure, LD₅₀, MTD (maximum tolerated dose) MED (maximum efficient dose) and melting point of the two nitrogen mustard derivatives

Figures of dose are all described as mg per Kg for tests on Yoshida sarcoma cells.

	LD ₅₀	MTD	MED
N-bis- β -chloroethyl-alanine hydrochloride $\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \\ \searrow \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \end{array} \cdot \text{HCl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ m. p. 96°—97°	30	10	0.05
Methyl-bis- β -chloroethyl-amine oxide hydrochloride $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \\ \searrow \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \end{array} \cdot \text{HCl} \\ \\ \text{O} \end{array}$ m. p. 109°—110°	80	40	1.00

The doses were determined by injection into the intraperitoneal cavity of the sarcoma rat. LD₅₀ was calculated from the numbers of animals surviving at 7 days after injection.

* Silk Science Research Institute, Tokyo and National Institute of Genetics, Misima

** Iatrochemical Institute of the Pharmacological Research Foundation, Tokyo.

¹ These derivatives of nitrogen mustards as well as many others, were prepared in the Iatrochemical Institute for a series of studies on the chemotherapy of malignant growth, employing Yoshida Sarcoma animals.

mated to double recessive female moths. The eggs from these matings were examined for their colours. For the estimation of mutation rates, the number of white or red eggs and mosaic eggs for white and red were expressed as proportion of the total number of pigmented eggs.

Results

With each substance two experiments were carried out. The results are summarised in Table 2. The bulk of the aberrant eggs in all experiments were mosaics. Wholly white or red eggs were rare, especially white ones; these non-mosaic aberrants formed from 2—14% of all aberrants. The frequencies of aberrant eggs in the experiments with N. M.-alanine were greater than in those with nitromine, although the concentration of the latter was higher, but this is natural when one considers the LD₅₀ and MED of the two substances. Hatchability, too, tended to be lower after treatment with N. M.-alanine than after treatment with nitromine. There was considerable variation in hatchability percentages between experiments with the same treatment, and the two experiments with nitromine mustard differed also in the frequencies of all aberrant eggs. These differences are, however, not relevant to the essential feature of these data, namely, the difference between the ratios of *pe/re* eggs according to the mutagen used. After treatment with nitromine this ratio was 1.06 in Expt. 2 and 1.58 in Expt. 3. An excess of *pe* eggs over *re* eggs is characteristic for treatment with nitromine; it was found in many other experiments with this substance. 1.06 in Expt. 2 is, in fact, the lowest *pe/re* ratio ever obtained with nitromine. In most experiments the value lay between 1.3 and 1.8; in several it exceeded 2.0 (Nakao unpubl.). The ratio in the control series, although based on too few aberrants to be exact, shows that also among eggs from untreated parents *pe* aberrants are in excess of *re* ones. The same is true for experiments in which the male moths had been exposed to X-rays. They always yield an excess of *pe* aberrants. One example is shown in Expt. 6 of Table 2. In contrast to all

Table 2. Frequencies of aberrations at marked loci *pe* and *re* and the ratios of *pe* to *re* when male moths were injected in their abdomen with nitromine or N. M.-alanine and were mated to double recessive *pere/pere* female moths. The distribution of lethals in three definite stages is also shown in the Table.

Treatment	Dose	Total No.	Hatched eggs	Died at the stage of			No. of tested eggs (total pigmented eggs)	Total aberrant eggs		Locus of aberrant eggs		Ratio <i>pe/re</i>
				before pigmen- tation ×	pigmen- tation ×	bluish egg × ×		No.	Percentage	<i>pe</i>	<i>re</i>	
Control	—	6937	6491	283	63	87	6654	13	0.20 ± 0.05	8	5	1.60
Nitromine	1/3% 0.05 ml	2909	834	158	582	1074	2751	261	9.49 ± 0.56	134	127	1.06
Nitromine	1/3% 0.05 ml	4716	3149	187	135	1024	4529	222	4.90 ± 0.10	136	86	1.58
N. M.-alanine	1/20% 0.05 ml	2776	1033	113	845	464	2663	327	12.28 ± 0.64	123	204	0.60
N. M.-alanine	1/20% 0.05 ml	2945	527	174	1015	842	2771	393	14.18 ± 0.66	146	247	0.59
X-rays	roent. 2925	3260	2580	92	55	519	3168	14	0.44 ± 0.12	11	3	3.67

The distribution of lethals in three definite stages are also shown in the Table.

¹ No. of aberrant eggs was not included in hatched eggs and in dead eggs. Therefore, Total No. = Hatched eggs + Dead eggs + Total aberrant eggs.

² 6 eggs in both Exps. 4 and 5 and 1 egg in Exp. 3 have black, white and red colours, therefore these eggs were calculated doubly as *pe*-aberrants and *re*-aberrants.

× Containing unfertilized eggs. × × Stages when embryonal body is completely formed.

these data are the low *pe/re* ratios after treatment with N. M.-alanine: 0.60 in Expt. 4 and 0.59 in Expt. 5. The great excess in these experiments of *re* eggs is the more striking as *pe re* eggs are white like *pe* eggs, so that the number of changes at the *re* locus probably is an underestimate.

The difference between the *pe/re* ratios in the pooled data from the two kinds of treatment is highly significant ($\chi^2 = 40.178$ for 1 D. F.). It remains significant when correction is made for the fact that the nitromine data are heterogeneous in themselves ($\chi^2 = 4.788$). Even if the *pe/re* ratio in the N. M.-alanine experiments is compared with only the lower one of the nitromine-induced ratios (1.06 in Expt. 2), the difference is statistically well secured.

The data in Table 2 might give the impression that the *pe/re* ratio depends not so much on the inducing mutagen as on the total frequencies of aberrant eggs, decreasing as this frequency increases. This, however, is not so. Even when the frequency of aberrant eggs after nitromine treatment was raised to 11.66 by using a $1\frac{1}{2}\%$ solution, the *pe/re* remained above 1 (1.16).

Discussion

Evidence has been presented that the ratios in which two kinds of genetical aberration are produced differ after treatment with two different chemical mutagens. For an interpretation of these results the true nature of the observed aberrations is of importance. Aberrant eggs of the studied types are presumed to be due mainly to deficiencies at the marked loci. Homozygotes for such aberrations are always lethal, crossing-over values between two loci which include the uncovered locus are considerably diminished, there seems to be pseudo-dominance, and so on (TAKAZAKI 1943, 1952, TAZIMA 1943, 1944). Unfortunately the silkworm has no chromosomes which, like the salivary chromosomes of *Drosophila*, allow to check this conclusion cytologically. A high proportion of the aberrants were mosaics. This is taken to show the delayed effect of the mutagens used (AUERBACH 1950, 1951).

Specific effects of mutagens on chromosome regions or individual loci have repeatedly been reported (DEMEREK 1955, EHRENBERG et al. 1956, FAHMY and FAHMY 1956, HADORN 1950, KÖLMARK 1953, LEVAN 1951, McLEISH 1953, OEHLKERS 1952, REVELL 1953). It would be particularly interesting if these specific relationships were caused by biochemical affinities between gene and mutagen. For the present results such an interpretation meets with the difficulty that probably only a small proportion of the aberrants were due to gene mutation, while the bulk were due to deficiencies. Perhaps one might postulate some specific relation between the chemical agent and the position of breakage in the chromosome. The fact that in the silkworm genes controlling similar characters are grouped together on the same chromosome makes such an assumption somewhat more plausible. It should, however, be noted that a reversion of the ratio between *pe* and *re* aberrants can also be obtained by irradiating wild-type female moths and mating them to multiply recessive males; this method yielded *pe/re* ratios which, like those produced by N. M.-alanine, were smaller than 1 (NAKAO 1956, TAZIMA, unpubl.).

In order to obtain more conclusive evidence for the nature of mutagen specificity in the silkworm, various agents of similar chemical structure should be applied to many other loci. On the other hand, the mechanism of the biological action of these agents should be thoroughly investigated. Studies of this kind are likely to lead to a better understanding of the nature of the gene and of the mechanism of mutation.

Summary

Relative frequencies of visible mutations (egg colour mutants) induced by two similar mutagenic agents of the mustard group, nitromine (methyl-bis- β -chloroethyl-amine N-oxide) and N. M.-alanine (N-bis- β -chloroethyl-alanine), have been studied in the silkworm. The solution of either agents was injected into the wild male moths, which were then mated to double recessive *pere/pere* female moths. (Normal eggs are black, *pere/pere* and *pe/pe* eggs are white and *re/re* eggs, red.) Eggs produced from these matings were examined for their colour and the mutation rates were estimated by the ratio of uncoverings at the marked loci to the total pigmented eggs.

Analysis of the results has revealed that the ratio of the mutation rates at the *pe*-locus to those at the *re*-locus varies markedly according to whether nitromine or N. M.-alanine is injected. When nitromine was used the ratios of *pe*-aberrants to *re*-aberrants were 1.06 and 1.58, while in the case of N. M.-alanine the ratios were 0.59 and 0.60. In many other experiments in which ♂♂ moths were treated with nitromine, the *pe/re* ratio was consistently greater than 1 and often as high as 2. The same was true for experiments with irradiated male moths. These results have been discussed in relation to possible specific interactions between chemical mutagens and chromosome loci.

Acknowledgment. We wish to express our sincere thanks to Dr. C. AUERBACH for her valuable suggestions and criticisms in the course of the work as well as for her kindness in reading the original manuscript.

Literature

AUERBACH, C.: Differences between effects of chemical and physical mutagens. Publ. Staz. zool. Napoli **22**, Suppl., 1 (1950). — Problems in chemical mutagenesis. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 199 (1951). — DEMEREC, M.: What is a gene? Twenty years later. Amer. Naturalist **89**, 5 (1955). — EHRENBERG, L., A. GUSTAFSSON and U. LUNDQUIST: Chemically induced mutation and sterility in barley. Acta chem. scand. **10**, 492 (1956). — FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. V. Differential genetic response to the alkylating mutagens and X-radiation. J. Genet. **54**, 146 (1956). — HADORN, E.: Weitere Ergebnisse der „in-vitro-Behandlung“ von *Drosophila*-Ovarien mit Phenol. Publ. Staz. zool. Napoli **22** (Suppl.), 32 (1950). — ISHIDATE, M., Y. SAKURAI, T. YOSHIDA, H. SATO and H. IMAMURA: Experimental studies on chemotherapy of malignant growth employing Yoshida sarcoma animals. V. Evaluation and comparison of curative effects of compounds tested using the diagram of „percentage survival“. Gann **45**, 484 (1954). — VI. Effect of N-bis- β -chloroethyl- γ -amino-acid and their derivatives. Gann **45**, 526 (1954). — KÖLMARK, G.: Differential response to mutagens as studied by the *Neurospora* reverse mutation test. Hereditas (Lund) **39**, 270 (1953). — LEVAN, A.: Chemically induced chromosome reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 233 (1951). — MCLEISH, J.: The action of maleic hydrazide in *Vicia*. Heredity **6**, Suppl., 125 (1953). — NAKAO, Y.: Action of irradiated cytoplasm on untreated chromosomes of the silkworm. Nature (Lond.) **172**, 625

(1953). — Differences between male and female treatment in visible X-ray induced mutation rates in the silkworm. Proc. Intern. Genet. Symp., (Cytologia Suppl.) **260** (1957) — OEHLKERS, F.: Chromosome breaks influenced by chemicals. Heredity **6**, Suppl., 95 (1952). — REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. Heredity **6**, Suppl., 107 (1953). — TAKAZAKI, T.: A possible influence of deficiencies on non-disjunction of the second chromosome in silkworm (in Japanese). Jap. J. Genet. **19**, 8 (1943). — Chapter VIII Cytogenetics in TANAKA (ed.): The Genetics of the silkworm, Shokabo, Tokyo 275 (1952) (in Japanese). — TAZIMA, Y.: Studies on chromosomal aberrations in the silkworm. I. Attachment of autosome and certain related problems. Bull. Sericul. exp. Stat. **11**, 525 (1943) (Japanese with English resume). — II. Translocation involving the second and W chromosomes. Bull. Sericul. exp. Stat. **12**, 109 (1944) (Japanese with English resume). — Mosaicism in the silkworm. Hokuryukan, Tokyo 1947 (in Japanese).

Dr. YOSHIO NAKAO, Biological Institute,
Kyoto Prefectural Medical College, Kyoto, Japan

Aus dem Zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG, GESCHLECHTSSPEZIFITÄT UND PHÄNOGENETISCHEN AUTONOMIE DER AUGEN-PTERINE VER- SCHIEDENER GENOTYPEN VON *DROSOPHILA MELANOGASTER**

Von

E. HADORN und I. ZIEGLER-GÜNDER

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Januar 1958)

I. Problemstellung

Das Stoffinventar an Pterinen wird durch Mutationen, die zur Veränderung der sichtbaren Augenfarbe führen, in spezifischer Weise beeinflusst (HADORN und MITCHELL 1951, HADORN und KÜHN 1953, HADORN 1954a, 1956). Bei *Drosophila* kommen Pterine im ganzen Körper vor, doch sind sie in besonders hoher Konzentration und großer qualitativer Mannigfaltigkeit in pigmentierten Organen, wie in den Augen, Malpighischen Gefäßen und Hoden vertreten. In der vorliegenden Arbeit befassen wir uns lediglich mit den Augenpterinen.

Zunächst stellten wir uns die Aufgabe, das Auftreten der verschiedenen Pterine und ihre Zu- oder Abnahme während der Metamorphose und zu Beginn des Imaginallebens zu untersuchen. Die Befunde können dazu beitragen, die noch weitgehend unbekannten gen- und entwicklungsphysiologischen Beziehungen der Pterine untereinander besser zu verstehen. Dabei vergleichen wir die Verhältnisse bei einem Wildstamm (S. 223) mit den wesentlich verschiedenen Pterinmustern der Genotypen *sepia* (S. 226), *white* und *cinnabar brown* (S. 227).

Nachdem für die Mutante *rosy*² (*ry*²) gezeigt werden konnte (HADORN und SCHWINCK 1956), daß transplantierte Organe sich in Bezug auf Pterine nicht autonom verhalten, prüften wir in reziproken Augentransplantationen die Autonomie der Pterinbildung bei der vom Wildtypus stark abweichenden Mutante *sepia* (S. 228).

Bei der Untersuchung der Augen der Wildrasse zeigte sich im Verlaufe der Arbeit (S. 225) ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Gehalt an Isoxanthopterin. Von diesem Befund ausgehend, interessierte uns die Frage, ob solche „biochemischen Geschlechtsmerkmale“ im geschlechtsfremden Wirt erhalten bleiben, ob sie sich also autonom oder nicht autonom verhalten (S. 231).

II. Methodik und Stoffinventar

Die Zeitangaben beziehen sich überall auf Temperaturen von $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Gezüchtet wurde auf dem üblichen Standardfutter (Mais-Hefe-Zucker-Agar). Die lebensfrischen Köpfe wurden paarweise (bei Puppen) oder einzeln (bei Imagines) auf den Startflecken des Chronatographiepapiers zerrieben. Die direkt am Papier gemessene Fluoreszenzintensität der einzelnen Pterinflecken diente zur Bestimmung der relativen Stoffmengen pro Kopf (zur Technik vgl. HADORN und KÜHN 1953, sowie ZIEGLER-GÜNDER und HADORN 1958). Da außer den Augen im übrigen Kopfgewebe nur verschwindende Mengen von Pterinen vorkommen, dürfen unsere Meßwerte als repräsentativ für Augenpterine gelten.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Georges- und Antoine Claraz-Schenkung.

Wie wir in einer anderen Arbeit zeigen (ZIEGLER-GÜNDER und HADORN 1958), können folgende Pterine einzeln oder in Gruppen quantitativ bestimmt werden:

1. Drosopterine (DP) = rote Augenfarbstoffe.
2. 2-Amino-6-oxypterincarbonsäure (PC).

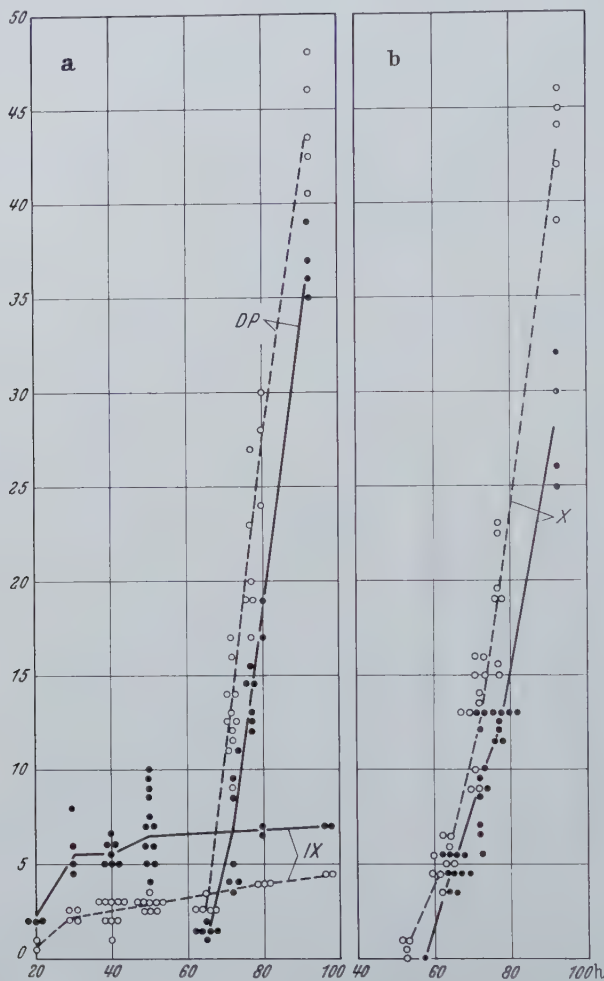


Abb. 1a u. b. Augen des Wildstammes (+): a (links) Bildungskurven für Drosopterine (DP) und Isoxanthopterin (IX) während der Puppenentwicklung. Abszisse: Alter in Stunden (h) nach Pupariumbildung. Ordinate: Meßwerte der Fluoreszenz. Einzelwerte je 2 Köpfe: ○ für ♀ und ● für ♂. Mittelwertskurven — — — für ♀ und — — — für ♂. b (rechts) entsprechende Darstellung für den „Xanthopterin“-Komplex (X)

3. Isoxanthopterin (IX).

4. „Xanthopterin“-Komplex (X); mit einem „X-Pterin“, das sich gleich verhält wie Xanthopterin, wurde noch ein weiteres Pterin gemessen, das dem Xanthopterin nahestehen dürfte.

5. Sepiapterin (SP), mit möglicher Beimischung von Riboflavin.

6. HB-Pterine, ein Komplex, der neben dem als 2-Amino-6-oxypterin identifizierten HB₁ noch ein zweites, himmelblau fluoreszierendes Pterin (HB₂) enthält, dessen Konstitution noch nicht feststeht. HB₂ ist stark photolabil und zerfällt unter Lichteinwirkung zur Pterincarbonsäure (PC).

III. Die Augenpterine eines Wildstammes (Sevelen)

1. Puppenentwicklung

In den Abb. 1 und 2 ist die Entwicklung der Pterine während der Metamorphose dargestellt. Das erste Auftreten der Pterine in den Augenanlagen ist schwierig zu bestimmen, da sehr schwache Konzentrationen sich nicht genügend meßbar von der Papierfluoreszenz abheben. Jedenfalls aber steht fest, daß in der Entwicklung zuerst das Isoxanthopterin rasch ansteigt und im Zeitraum von 20—50 Std nach der Pupariumbildung annähernd seine Maximalkonzentration erreicht (Abb. 1a). Die Drosopterine (rote Augenfarbstoffe) erscheinen dagegen erst

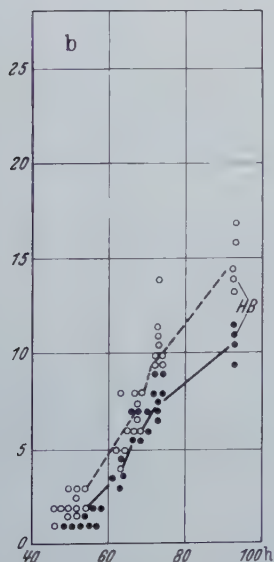
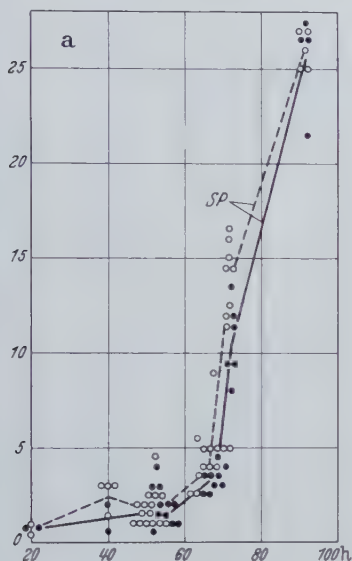


Abb. 2

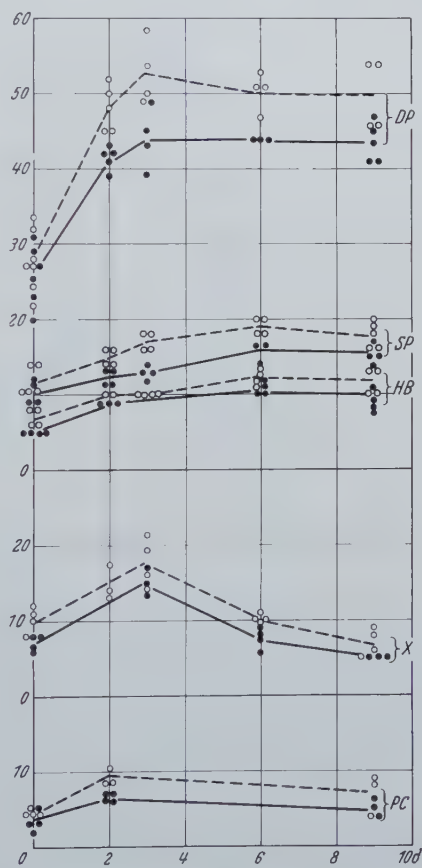


Abb. 3

Abb. 2 a u. b. Augen des Wildstammes (♂): a (oben) Bildungskurven für das Sepiapterin (SP), b (unten) für die HB-Pterine (HB). Darstellung und Symbole wie in Abb. 1

Abb. 3. Augen des Wildstammes (♂): Veränderungen im Pteringehalt bei jungen Imagines. Abszisse: Zeit in Tagen (d) nach dem Schlüpfen. Ordinate: Meßwerte der Fluoreszenz für je einen Kopf. o und — für ♀; ● und — für ♂. DP Drosopterine, SP Sepiapterin, HB HB-Pterine, X „Xanthopterin“-Komplex, PC Pterincarbonensäure

nach der 60. Std; ihre Menge steigt anschließend rasch und andauernd an (Abb. 1a).

Für den „Xanthopterin“-Komplex (X, Abb. 1b), das Sepiapterin (SP, Abb. 2a) und die HB-Pterine (Abb. 2b) ergibt sich ebenfalls ein Anstieg, der

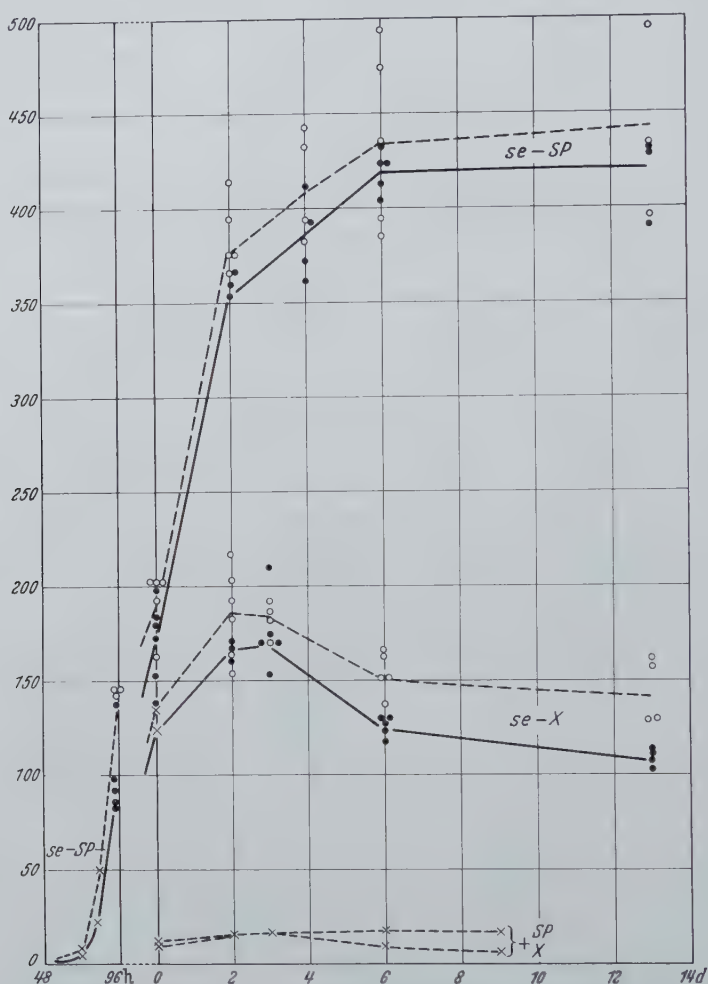


Abb. 4. Augen der Mutante *sepiapterin* (*se*): Entwicklung des Sepiapterins (SP) während der Metamorphose (48–96 Std nach Pupariumbildung) und im Verlaufe des Imaginallebens (0–13 d nach dem Schlüpfen). $\circ$ und $\times$ — — — für φ , $\bullet$ und — — — für σ (je ein Kopf), $\times$ Mittelwerte aus 4–8 Messungen. Für das Xanthopterin (X) des *sepiapterin*-Stammes ist nur die imaginale Veränderung angegeben, die pupalen Kurven verlaufen ähnlich wie für das Sepiapterin. Unten: Pterinmengen des Kontroll-Wildstammes ($\pm$) für weibliche Köpfe (maßstäblich übertragen aus Abb. 3)

erst in der zweiten Hälfte der Pupalzeit (60–92 Std) intensiv einsetzt. Da das Isoxanthopterin wahrscheinlich aus HB_1 durch die Wirkung der Xanthinoxidase entsteht (FORREST, GLASSMAN und MITCHELL 1956, HADORN 1956), wäre zu erwarten, daß HB_1 vor oder gleichzeitig mit dem Isoxanthopterin auftreten müßte. Doch könnte es sich hier um kleine Mengen handeln, die sofort zu Isoxanthopterin oxydiert würden und daher nicht meßbar in Erscheinung treten müßten. Aus den Kurven der Abb. 2b ist ersichtlich, daß wir über die früh-

pupale Konzentration von HB_1 keine Aussagen machen können. Dagegen ist bei den Genotypen *w* und *cn bw* (Abb. 7) ein frühes Auftreten von HB-Pterinen nachzuweisen. In geringen Konzentrationen tritt auch das gelbe Sepiapterin frühzeitig auf (Abb. 2a und 7). Das späte Erscheinen der Drosopterine ist

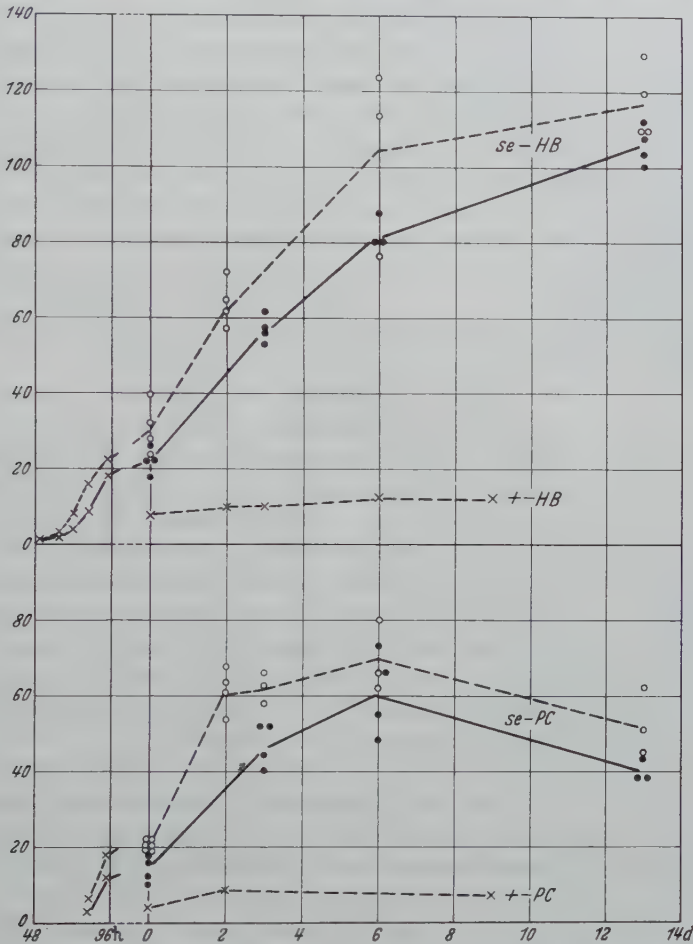


Abb. 5. Augen der Mutante *sepia* (*se*): Entwicklung der HB-Pterine (oben) und der Pterincarbon-säure (PC, unten). Bezeichnungen und Stadien wie in Abb. 4. Vergleich mit den Stoffmengen des Kontroll-Wildstammes (+) für weibliche Köpfe (aus Abb. 3 übertragen)

jedenfalls vereinbar mit der Annahme, wonach die roten Augenfarbstoffe aus irgendeinem der anderen Pterine, z. B. aus dem Sepiapterin, hervorgehen könnten (FORREST und MITCHELL 1955, DANNEEL 1955).

Bemerkenswert ist sodann der Befund, daß die Augen der Männchen auf allen untersuchten Stadien (Abb. 1a) $1\frac{1}{2}$ —2mal soviel Isoxanthopterin enthalten als weibliche Augen. Darin äußert sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied, den wir später (S. 231) eingehender untersuchen und diskutieren werden. Dagegen sind alle anderen Pterine in höheren Quantitäten im weiblichen Auge vertreten. Hier handelt es sich aber kaum um einen echten geschlechtsspezifischen Unterschied. Die höheren Meßwerte der Weibchen dürften lediglich

darauf beruhen, daß Weibchen durchschnittlich größer sind als Männchen und daher auch größere Augen haben, die entsprechend mehr Pterine enthalten als die Augen der Männchen (HADORN 1957).

2. Frühimaginale Veränderungen

Nach dem Schlüpfen der Fliegen steigt zunächst die Menge sämtlicher gemessener Pterine noch an (Abb. 3). Im Alter von rund 3 Tagen ist dabei ein Maximalwert erreicht, der für die Drosopterine und die HB-Perine wie auch für das Sepiapterin bis zum 10. Imaginaltag sich nicht mehr wesentlich ändert. Dagegen sinkt das X-Pterin deutlich ab. Vielleicht ließe sich auch bei der Pterincarbonensäure eine Abnahme nachweisen. Wegen der starken Konzentration der übrigen Pterine war es nicht möglich, auch die imaginalen Veränderungen im Isoxanthopteringehalt zu messen; wahrscheinlich nimmt im Imaginalauge auch diese Verbindung ab.

Überall übertreffen die Meßwerte der weiblichen Augen diejenigen der Männchen (Einfluß der Körpergröße).

IV. Die Mutante *sepia* (se)

Aus zahlreichen Arbeiten (vgl. MAINX 1938, HADORN und MITCHELL 1951, FORREST und MITCHELL 1954, DANNEEL und ESCHRICH 1956) ist bekannt, daß die Mutante *sepia* einerseits keine roten Augenfarbstoffe (Drosopterine) bildet, andererseits große Mengen eines gelben Stoffes ansammelt, den wir als *Sepiapterin* (SP) bezeichnen (ZIEGLER-GÜNDER und HADORN 1958). Aus der Abb. 4 ist ersichtlich, daß der SP-Stoff schon während der Puppenentwicklung zu hohen Konzentrationen ansteigt und daß anschließend bei jungen Imagines die Vermehrung bis zum 6. Tage noch intensiv anhält. Damit wird im *sepia*-Auge eine Stoffmenge erreicht, die rund 20mal höher ist als bei Wildaugen (Mittelwertskurve für SP des Wildgenotypus unten in Abb. 4).

Sehr wesentlich über das Niveau des Wildstammes hinausgehende Konzentrationen stellen wir auch für den „Xanthopterin“-Komplex fest (Abb. 4, se-X). Hier macht sich allerdings eine Abnahme der Stoffmenge vom 3. Imaginaltage an geltend, was in Übereinstimmung steht mit den Messungen beim Wildstamm (Abb. 3, X).

Die HB-Pterine der *sepia*-Mutante steigen ebenfalls zu weit übernormalen Konzentrationen an (Abb. 5, oben). Dabei setzt sich die Zunahme im Imaginalauge in ähnlicher Weise durch wie für die Sepiapterine (Abb. 4, oben). Schließlich bewirkt das *sepia*-Gen auch eine Anreicherung der Pterincarbonensäure (Abb. 5, unten), die bei *sepia* um ein Mehrfaches stärker vertreten ist als im Wildauge (Abb. 5, +—PC).

Bei allen in Abb. 4 und 5 berücksichtigten Pterinen wurden höhere Werte für weibliche als für männliche Augen festgestellt. Damit bestätigen sich die am Wildtypus erhobenen Befunde.

Das *Isoxanthopterin* wurde nur während der Puppenentwicklung gemessen. Im Imaginalauge läßt es sich wegen der starken Konzentration der übrigen Pterine nicht genügend abtrennen. Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß das *Isoxanthopterin* bei *sepia* genau so wie beim Wildtypus (Abb. 1) frühzeitig erscheint und seine maximale Konzentration erreicht, bevor die anderen Pterine auftreten

oder doch bevor sie wesentlich ansteigen. Übereinstimmung zum Wildgenotypus besteht außerdem darin, daß das männliche Auge auch bei *sepia* mehr Isoxanthopterin enthält als das weibliche.

Da die chemische Konstitution des Sepiapterins noch nicht mit Sicherheit angegeben werden kann, erscheint es uns verfrüht, die biochemisch pleiotropen Auswirkungen des *se*-Gens, die zum Ausfall der Drosopterine und zur übermäßigen Anreicherung des Sepiapterins, des „Xanthopterin“-Komplexes, der Pterincarbonsäure und der HB-Pterine führen, zu diskutieren oder gar zu deuten. Die Frage nach der genetischen Autonomie der biochemischen *sepia*-Augenphäne wird auf S. 228 besprochen.

V. Genotypen mit weißen Augen

Bei älteren Imagines der Genotypen, die keine roten Augenpigmente (Drosopterine) bilden, fehlen auch die übrigen Pterine (HADORN und MITCHELL 1951). Dabei handelt es sich aber nicht um eine genbedingte Unfähigkeit zur Pterinsynthese; denn in früheren Entwicklungsstadien erscheinen auch bei den Genotypen *white* (*w*) und *brown* (*bw*) die meisten Pterine in ansehnlichen Quantitäten (HADORN 1954b). Einzig die Drosopterine können zu keiner Zeit gebildet werden. Die andere Pterine, so vor allem das Isoxanthopterin, werden während der Puppenentwicklung zunächst angereichert. Ihre Menge fällt dann zu Beginn des Imaginallebens rasch ab, so daß bereits bei 3 Tage alten Fliegen kaum mehr meßbare Flecken in den Chromatogrammen auftreten. Wie HADORN und KÜRSTEINER (1955) zeigen konnten, werden diese aus dem Körper verschwindenden Pterine mit den Exkreten (besonders den Meconien) in viel höheren Quantitäten ausgeschieden als bei den Wildgenotypen, wo Körperpterine zeitlebens in hohen Konzentrationen vorkommen.

Diese bisherigen Befunde haben sich auf ganze Tiere bezogen. Jetzt fragen wir, wie sich die Pterinmengen im Auge, d. h. in einem einzelnen Organsystem bei Genotypen ändern, die keine Drosopterine bilden können. Untersucht wurden die weißäugigen Genotypen *white* (*w*) und *cinnabar brown* (*cn bw*). Aus Abb. 7 ist ersichtlich, daß die Mengen an Isoxanthopterin, HB-Pterinen und Sepiapterin im Auge während der Puppenentwicklung zunächst ansteigen. Überall wird ein Maximum um die 60.—70. Std nach der Pupariumbildung erreicht. Mit fortschreitender Metamorphose sinken die Pterinwerte übereinstimmend ab, so daß im Auge der schlüpfreifen Imago keine oder nur noch verschwindende Pterinmengen mehr nachweisbar sind. Dieser Abfall ist ein durchaus mutationsspezifisches Phänomen. Das ergibt sich aus einem Vergleich mit den Bildungskurven der Augenpterine im Wildgenotypus (+). Hier erfolgt der

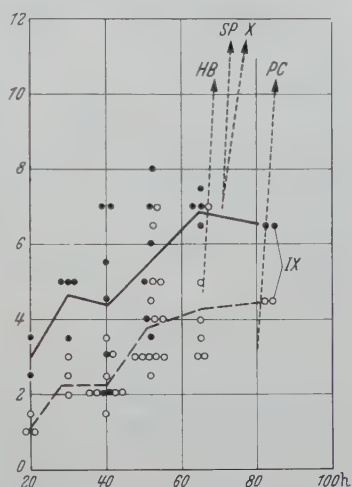


Abb. 6. Augen der Mutante *sepia*: Bildungskurve für Isoxanthopterin (IX) während der pupalen Entwicklung. Abszisse: 20—80 Std nach Pupariumbildung. Ordinate: Fluoreszenzintensität für je 2 Köpfe ($\circ$ = ♀, $\bullet$ = ♂). Die stark aufsteigenden Pfeile (punktirt) deuten Zeitpunkt und Ausmaß der intensiven Vermehrung der übrigen Pterine an

intensive Anstieg für HB-Pterine und Sepiapterin zu einer Zeit, da sich bei *w* und *cn bw* der stärkste Abfall vollzieht. Für das Isoxanthopterin, das im Wildgenotypus früher als andere Pterine ansteigt (Abb. 1 und 7), fällt der Abfall bei *w* und *cn bw* zusammen mit einem leicht ansteigenden Plateau im Wildgenotypus.

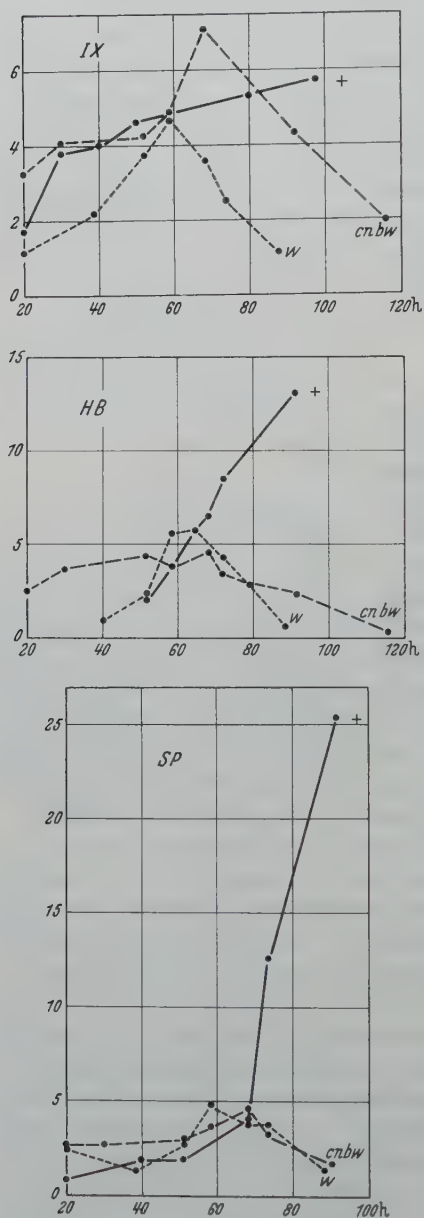


Abb. 7

Ein Vergleich der Augenbefunde mit den Abfallkurven, die sich auf die gesamte Körpersubstanz beziehen (HADORN 1954b), zeigt folgendes: die Pterine verschwinden im „weißen“ Auge schon während der Endphase der Metamorphose, dagegen können sie aus dem Körper erst nach dem Schlüpfen der Imagines entfernt werden.

VI. Zur phänogenetischen Autonomie der *sepia*-Mutante

Nach den Untersuchungen von BEADLE und EHRUSSI (1936) gehört *sepia* zu den autonomen Mutationen. Transplantierte *se*-Augenanlagen entwickeln im *+*-Wirt die für die Mutante charakteristische schwarz-braune Augenfarbe. Ebensovienig wird die Pigmentierung der Wirtsaugen durch ein Implantat beeinflusst. Eine entsprechende Autonomie ergab sich auch in den reziproken Transplantationen. Diese Befunde beziehen sich aber nur auf die sichtbare Augenfarbe. Sie sagen nichts aus über allfällige Einflüsse der genetisch verschieden konstituierten Umgebung auf die übrigen Pterine. Nachdem sich gezeigt hatte (ZIEGLER-GÜNDER und

Abb. 7. Augenpterine: Entwicklung von Isoxanthopterine (IX), HB-Pterinen (HB) und Sepiapterin (SP) während der Metamorphose, vergleichsweise für den Kontroll-Wildstamm *+* (ausgezogene Kurven) und die Genotypen *w* (punktierte Kurven) und *cn bw* (unterbrochene Kurven). Abszisse: Alter in Stunden (h) nach Pupariumbildung. Aus den Mittelwerten der Einzelmessungen (je 3–12 ♂ und ♀) wurde ein Durchschnitt für beide Geschlechter zusammen berechnet (Kurvenpunkte)

HADORN 1958), daß heterozygote *se/+*-Augen sich im Pterininventar von *+/+*-Augen unterscheiden, obschon die sichtbare Augenfarbe eine vollständige Dominanz von *+* über *se* vortäuscht, schien es gegeben, auch die Autonomie erneut zu überprüfen. Mit den nun zur Verfügung stehenden chromatographischen

Tabelle 1. Mittelwerte der relativen Pterinmengen bei Wirt (W) und Implantat (I) für je 2 Augen eines Wildstammes (+) und der Mutante *sepia* (se)

Die Zahl der Einzelmessungen ist in Klammern angegeben (z. B. 7). DP = Drosopterine, PC = Pterincarbonsäure, IX- und X-Isoxanthopterin und „Xanthopterin“-Komplex, SP = Sepiapterin, HB = HB-Pterine. Fehlen des Stoffes ist mit — bezeichnet; nicht gemessenes Vorkommen mit (?)

Experiment	Fluoreszenzintensität (relative Stoffmenge)				
	DP	PC	IX und X	SP	HB
I a) W +	35,7 ± 1,2 (3)	(?)	22,7 ± 1,7 (3)	12,7 ± 1,2 (3)	3,3 ± 0,7 (3)
b) I +	24,7 ± 0,9 (3)	(?)	13,0 ± 0,6 (3)	4,0 ± 0,9 (4)	2,5 ± 0,8 (4)
II a) W <i>se</i>	—	54,3 ± 1,9 (11)	103,5 ± 3,4 (11)	265,7 ± 10,3 (10)	40,0 ± 2,3 (8)
b) I <i>se</i>	—	34,4 ± 1,8 (11)	60,7 ± 2,3 (10)	98,7 ± 6,2 (10)	27,8 ± 1,8 (8)
III a) W <i>se</i>	—	67,4 ± 3,9 (7)	161,1 ± 13,0 (7)	282,1 ± 20,6 (7)	57,5 ± 4,2 (8)
b) I +	25,3 ± 2,7 (6)	(?)	16,3 ± 1,8 (6)	5,1 ± 1,7 (7)	5,0 ± 2,3 (6)
IV a) W +	38,4 ± 1,2 (14)	(?)	18,0 ± 0,9 (13)	9,8 ± 0,8 (16)	7,5 ± 2,0 (13)
b) I <i>se</i>	—	40,9 ± 3,5 (15)	81,2 ± 4,9 (13)	112,2 ± 7,7 (15)	34,5 ± 0,4 (13)

und fluorometrischen Methoden war zu untersuchen, ob die postulierte Autonomie der *se*-Merkmale für verschiedene biochemische Phäse des pleiotropen Wirkungsmusters gilt. Eine solche Prüfung wurde auch durch die überraschenden Befunde nahegelegt, die an der *rosy*-Mutante erhoben werden konnten (HADORN und SCHWINCK 1956).

In üblicher Weise wurden larvale Augen-Imaginalseiben in Larven des 3. Stadiums injiziert. Dabei implantierten wir je 2 Augenanlagen in einen Wirt. Drei Tage nach dem Schlüpfen der Imagines wurden die beiden metamorphosierten und voll ausgefärbten Implantatsaugen zusammen auf einem Startfleck des Chromatographiepapiers aufgetragen. Auf dem gleichen Papier chromatographierten wir auch die Wirtsaugen; so können wir die Pterinmengen von Wirt und Implantat direkt vergleichen.

In der Tabelle 1 sind alle erfolgreichen und quantitativ ausgewerteten Transplantations-Kombinationen (I—IV) angegeben. Es wurden stets männliche Seiben in Männchen implantiert. Eine weitere Vergleichsmöglichkeit ergibt sich aus Abb. 8.

Als Nebenergebnis stellen wir fest, daß Implantatsaugen, falls sie dem gleichen Genotypus wie die Wirtsaugen zugehören, stets weniger Pterine enthalten als die Augen des Wirts. Dieser Befund ergab sich auch in anderen Transplantationsexperimenten (HADORN und SCHWINCK 1956, HADORN 1957). Diese Reduktion mag darauf beruhen, daß implantierte Augen nicht zur Größe eines Wirtsauges heranwachsen können. Vielleicht sind überdies auch die Bedingungen für die Pterinsynthese im Abdomen nicht optimal.

Die Beurteilung der entscheidenden Frage nach der Autonomie der biochemischen Merkmalsbildung hat von der Tatsache auszugehen, daß *se* sich von + in folgenden Merkmalen unterscheidet: Bei *se* fehlen die Drosopterine, dagegen sind die Quantitäten der übrigen Pterine gegenüber dem Wildtyp verstärkt (Abb. 4 und 5). Allfällige Wirtseinflüsse könnten sich daher so auswirken, daß die Pterinmengen in Richtung der Phäse des Wirtsgenotypus abgeändert würden. Ein solcher Effekt ist aber bei keiner Versuchsanordnung festzustellen.

Die Drosopterine der implantierten $+$ -Augen sind im se -Wirt mindestens ebenso stark vertreten wie im $+$ -Wirt, und ein se -Implantat vermag keine roten Augenfarbstoffe zu bilden, auch wenn es sich im $+$ -Wirt entwickelt. In der Bildung der übrigen Pterine (PC, IX und X, SP, HB) manifestiert sich ebenfalls eine völlige Autonomie. So enthalten vor allem die se -Implantate der $+$ -Wirte die für se charakteristisch hohen Pterinmengen. Die durchschnittlichen Meßwerte liegen sogar überall über dem Niveau der se -Implantate, die sich im eigenen

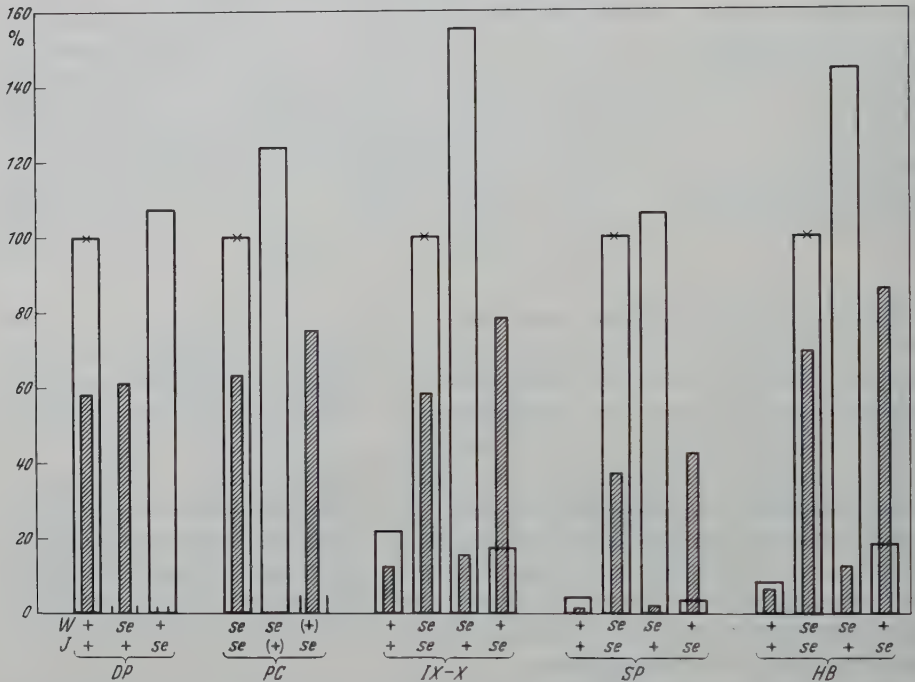


Abb. 8. Prozentuale Relativwerte der Augenpterine in reziproken Transplantationen zwischen Wildtypus ($+$) und *sepia* (se), berechnet nach den Direktwerten der Tabelle 1. Mit 100 % (Ordinate) wurde für Drosopterine (DP) der Fluoreszenzwert des Wildgenotypus und für die übrigen Pterine der Fluoreszenzwert der *sepia*-Mutante eingesetzt (je mit x bezeichnet). Leere breite Säulen stehen für die Pterine des Wirtes (W), schraffierte schmale Säulen für die Pterine der Implantate (J). Unten: Angabe der Versuchsanordnungen und der Pterinfraktionen

se -Genotypus entwickeln konnten. Ebenso wenig läßt sich ein spezifischer Einfluß der se -Wirte auf die $+$ -Implantate nachweisen; die bei $+$ -Kontrollen relativ schwach vertretenen Pterine (IX und X, SP, HB) bleiben auch als Implantate in se -Wirten auf dem tiefen Niveau des Normalgenotypus.

Somit lassen sich weder in den Implantaten noch in den Wirtsaugen stoffliche Abweichungen von den Kontrollen nachweisen, die als nicht autonome Phäne zu deuten wären. Andererseits muß aber auffallen, daß in allen Kombinationen diejenigen Implantate, die in genotypisch fremden Wirten aufwachsen, durchschnittlich etwas höhere Pterinmengen enthalten als die Implantate der gengleichen Kombinationen. Entsprechend erscheint — von einigen Ausnahmen abgesehen — bei Anwesenheit eines genfremden Implantates auch im Wirtsauge die Pterinbildung gefördert. Diese Phänomene sind aber noch keineswegs genügend gesichert. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß hier eine Art von „extrazellulär bedingter Heterosis“ vorliegen könnte.

VII. Das Isoxanthopterin in transplantierten Augen

In der Bildung von Isoxanthopterin manifestiert sich ein starker geschlechtsspezifischer Unterschied. Zur Schlüpfzeit enthalten die männlichen Fliegenkörper rund 3—4mal mehr von diesem Stoff als die Weibchen (HADORN und MITCHELL 1951). Der Unterschied beruht vor allem auf dem sehr hohen Isoxanthopteringehalt der Hoden. In den Ovarien finden sich dagegen nur Spuren von Isoxanthopterin. Diese „biochemische Geschlechtsspezifität“ wirkt sich aber nicht nur in den Geschlechtsorganen, sondern auch in den Augen (S. 225 und Abb. 1) aus. In den (kleineren) Männchenaugen findet sich bis doppelt soviel Isoxanthopterin als in den größeren Augen der Weibchen.

Es war nun durch reziproke Transplantationen zu prüfen, ob die Speicherung oder Bildung von Isoxanthopterin in der Augenanlage autonom oder nicht autonom erfolgt. Es kamen je 2 Imaginalscheiben aus annähernd verpuppungsreifen Larven in gleichalterige Wirte zur Implantation. Rund 40—50 Std nach der Pupariumbildung wurden die Wirte seziert und sowohl Wirts- wie Implantatsaugen eindimensional chromatographiert (Propanol-Ammoniak). Homogene Serien konnten dadurch erreicht werden, daß der Ausfärbungsgrad der durch das Puparium durchscheinenden Wirtsaugen als Zeitmaß für die erreichte Entwicklungshöhe benutzt wurde. Wir chromatographierten nach dem Einsetzen der Ommochrombildung, aber vor dem Auftreten der roten Augenpigmente. Auf dieser Stufe erscheinen die Augen bräunlich-gelb. Wirts- und Implantatsaugen unterscheiden sich dabei kaum in ihrem Ausfärbungsgrad. Für die Isoxanthopterin-Bestimmung wurde ein relativ früher Zeitpunkt gewählt, weil mit dem Auftreten der roten Augenpigmente (Drosopterine) auch die anderen Pterine stark ansteigen (Abb. 1 und 2) und den Isoxanthopterinfleck „überlaufen“, so daß dessen Messung auf dem Chromatogramm erschwert wird. Andererseits wissen wir, daß in Puppen mit bräunlich-gelben Augen das früh auftretende Isoxanthopterin in den Augen annähernd die volle Endkonzentration erreicht hat (Abb. 1).

Um eine genügend meßbare Isoxanthopterinmenge zu erhalten, wurden pro Startfleck 6 Augen aufgetragen. Die Messung der Flecken erfolgte wie überall in dieser Arbeit direkt am Papier und zwar mit einem Filtersystem, das für das violettblaue Fluoreszenzlicht des Isoxanthopterins gut durchlässig ist. Es gelang dabei, selbst noch jene Spuren von Isoxanthopterin zu messen, die im Lichte der UV-Lampe für unser Auge eben noch wahrnehmbar sind.

Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Wir stellen zunächst fest, daß in diesen Serien die männlichen Wirtsaugen rund 3—4mal höhere Meßwerte für Isoxanthopterin liefern als die weiblichen Augen. Ein Einfluß der geschlecht fremden Implantate auf die Wirtsaugen macht sich dabei nicht geltend. Die Implantatsaugen erreichen durchschnittlich die gleiche Isoxanthopterinmenge wie die Augen ihrer Wirte. Dieses Ergebnis ist deshalb bemerkenswert, weil die nicht evaginierenden Implantatsaugen kleiner als Wirtsaugen bleiben und nach anderen Befunden (HADORN und SCHWINCK 1956, HADORN 1957 und S. 229) deutlich weniger andere Pterine bilden als Wirtsaugen in situ (vgl. Abb. 8 und Tabelle 1). Offenbar ist für die Isoxanthopterinanreicherung das abdominale Milieu optimal.

Als Hauptergebnis stellen wir fest, daß einzig der Wirtsorganismus über die Isoxanthopterinmenge in implantierten Augen entscheidet. Entgegen ihrer

chromosomalen Konstitution enthalten männliche Implantate in weiblichen Wirten (Abb. 9, II) lediglich die für das tiefe Weibchenniveau charakteristische Menge (I), und umgekehrt findet man in weiblichen Implantaten, sofern sie vom männlichen Milieu umgeben sind (IV), nicht weniger Isoxanthopterin als in der Männchen-Männchen-Kombination (III). Die große Streuung der Meßwerte, wie sie sich besonders für Implantate zeigt, beeinträchtigt die Deutung der Ergebnisse nicht. Sie beruht wohl,

abgesehen von den Fehlermöglichkeiten des Chromatographierens und der Meßtechnik, vor allem auf den schwierig zu vermeidenden Entwicklungsunterschieden zur Zeit des Implantierens, teils aber auch auf der nicht genügend genau faßbaren Entwicklungshöhe zur Zeit des Sezierens.

Die Frage, wie diese Nichtautonomie der Merkmalsbildung zustande kommt, muß vorläufig offen bleiben. Dabei stehen 2 Möglichkeiten zur Diskussion: 1. Das Isoxanthopterin wird außerhalb des Auges gebildet und von ihm lediglich gespeichert. 2. Das Isoxanthopterin wird im Auge selbst synthetisiert, dies allerdings aus Vorstufen, die das umgebende nutritive Milieu zur Verfügung stellt.

Für beide Fälle ist durch unsere

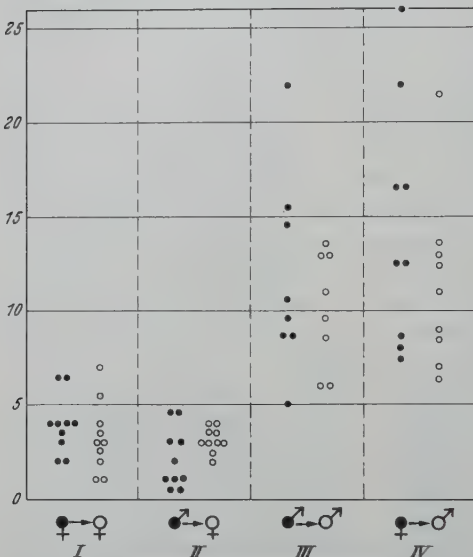


Abb. 9. Fluoreszenzwerte (Ordinate) für Isoxanthopterin. Jeder Meßpunkt bezieht sich auf 6 Augen. Ausgefüllt: Implantatsaugen. Leer: Wirtsaugen. Unten die 4 Versuchsanordnungen (I—IV)

Transplantationen bewiesen, daß ein geschlechtsdimorphes „biochemisches Organmerkmal“ durch die chromosomale Konstitution des geschlechtsfremden Gesamt-Organismus bestimmt wird.

Zusammenfassung

1. Das zeitliche Auftreten und die Anreicherung der verschiedenen Pterine im Auge eines Wildstammes von *Drosophila melanogaster* wird chromatographisch und durch Messung der Fluoreszenzintensitäten quantitativ untersucht.

2. Während der Puppenentwicklung erreicht zuerst das Isoxanthopterin seine Endkonzentration. Die anderen Pterine treten im Auge erst in der Endphase der Metamorphose in größeren Quantitäten auf.

3. In den Augen der jungen Imagines werden die Drosopterine (rote Augenfarbstoffe) wie auch das Sepiapterin und die HB-Pterine zunächst noch vermehrt. Vom 4. Tage an bleibt ihre Menge annähernd konstant erhalten. Dagegen vermindert sich die Stoffmenge im „Xanthopterin“-Komplex vom 3. Imaginaltage an.

4. Die Mutante *sepia* (*se*) unterscheidet sich in ihrem Pteringehalt vom Wildtypus nicht nur in einer vielfachen Vermehrung des gelben „Sepiapterins“,

sondern auch andere Pterine erreichen Quantitäten, die den Gehalt in Wildtypaugen weit übertreffen.

5. Bei weißäugigen Genotypen *white* (*w*) und *cinnabar brown* (*cn bw*) werden während der Puppenentwicklung auch Augenpterine gebildet, doch nimmt ihre Konzentration bei älteren Puppen wieder stark ab.

6. Mit reziproken Transplantationen von Augenimaginalscheiben wird gezeigt, daß sich die biochemischen Pterinphäre der *sepia*-Mutante in *+*-Wirten autonom manifestieren; desgleichen wird auch Autonomie der Merkmalsbildung für implantierte *+*-Augen in *sepia*-Wirten nachgewiesen.

7. Im Isoxanthopteringehalt der Augen manifestiert sich ein geschlechtsspezifischer Einfluß, indem bei Männchen bedeutend höhere Quantitäten vorkommen als bei Weibchen.

8. Reziproke Transplantationen von männlichen und weiblichen Augenanlagen der Wildrasse zeigen, daß in den Implantaten ein Isoxanthopteringehalt zustande kommt, der nicht der eigenen genetischen Konstitution, sondern derjenigen des geschlechtsfremden Genotypus des Wirtes entspricht. In dieser Hinsicht verhalten sich die Augenanlagen nicht autonom.

Summary

1. The developmental sequence of appearance and accumulation of the different eye-pteridines of the wild genotype of *Drosophila melanogaster* has been investigated quantitatively.

2. The developmental pattern of biochemical pleiotropy of the genotypes *sepia* (*se*), *white* (*w*) and *cinnabar brown* (*cn bw*) was studied and compared with the biochemical phenes of wild type eyes.

3. Reciprocal transplantations show that the eyes of the *sepia* mutant develop autonomously with respect to the quantities of the different pteridines.

4. A much higher quantity of isoxanthopterin was found in eyes of males than of females. This difference represents a secondary sex character of biochemical nature.

5. The amount of isoxanthopterin in transplanted imaginal eye discs corresponds with the sex of the host and not with the sex of the intrinsic genetic constitution. Thus a non-autonomous character forming process was observed.

Literatur

BEADLE, G. W., and B. EPHRUSSI: The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics* **21**, 225—247 (1936). — DANNEEL, R.: Über die beiden gelbäugigen Mutanten *se v* und *se cn* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. *Naturwissenschaften* **42**, 566 (1955). — DANNEEL, R., u. B. ESCHRICH: Untersuchungen über den gelben Augenfarbstoff der Mutante „*sepia*“ von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturforsch.* **11b**, 105—110 (1956). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: Pteridines from *Drosophila*. *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5658—5662 (1954). — Pteridines from *Drosophila*. Isolation and identification of three more pteridines. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4865—4869 (1955). — FORREST, H. S., E. GLASSMANN and H. K. MITCHELL: Conversion of 2-Amino-4-Hydroxypteridine to Isoxanthopterin in *D. melanogaster*. *Science* **124**, 725—728 (1956). — HADORN, E.: Approaches to the study of biochemical and developmental effects of mutations. *Caryologia* (Pisa) Suppl. **6**, 326—337 (1954a). — Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. *Experientia* (Basel) **10**, 483—484 (1954b). — Patterns of biochemical and developmental pleiotropy. *Cold Spr. Harb. Symp.*

quant. Biol. **21**, 363—373 (1956). — Über die Bildung der roten Augenpigmente von *Drosophila melanogaster* in Transplantaten. Rev. suisse Zool. **64**, 317—325 (1957). — HADORN, E., u. A. KÜHN: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarb-Genen bei *Ephesia kühniella*. Z. Naturforsch. **8b**, 582—589 (1953). — HADORN, E., u. R. KÜRSTEINER: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **30**, 8—12 (1955). — HADORN, E., and H. K. MITCHELL: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paperchromatography. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 650—665 (1951). — HADORN, E., u. I. SCHWINCK: Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante (*rosy*²) von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 528—553 (1956). — MAINX, F.: Analyse der Genwirkung durch Faktorenkombination. Versuche mit den Augenfarbfaktoren von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 256—276 (1938). — ZIEGLER-GÜNDER, I., u. E. HADORN: Manifestation rezessiver Augenfarb-Gene im Pterin-Inventar heterozygoter Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 235—245 (1958).

Anmerkung bei der Korrektur: Nach neuesten Befunden an transplantierten Hoden (HADORN, GRAF und URSPRUNG 1958, Revue Suisse de Zool.) dürfte die Nichtautonomie des Augen-Isoxanthopterins auf geschlechtsspezifischen Unterschieden im Gehalt an Xanthindehydrogenase des Wirtes beruhen.

Professor Dr. ERNST HADORN,
 Zoologisch-vergl.-anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz),
 Künstlergasse 16

Aus dem Zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich

MANIFESTATION REZESSIVER AUGENFARB-GENE IM PTERIN-
INVENTAR HETEROZYGOTER GENOTYPEN VON *DROSOPHILA*
MELANOGASTER *

Von

I. ZIEGLER-GÜNDER und E. HADORN

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Januar 1958)

I. Problemstellung

Ein Erbfaktor wird dann als rezessiv bezeichnet, wenn er in heterozygoter Vertretung keine Auswirkung zeigt. So gelten die Augenfarb-Faktoren *sepia* (*se*) und *white* (*w*) deshalb als rezessiv gegenüber ihren Wildallelen (+), weil die Augenfarben der Heterozygoten (*se*/+ oder *w*/+) normal wildrot erscheinen.

Da sich nun aber Augenfarbgene nicht nur in den sichtbaren Pigmenten, sondern auch in einer Reihe fluoreszierender Pterine quantitativ und qualitativ auswirken (HADORN und MITCHELL 1951, HADORN 1954a, 1956), ist zu untersuchen, ob die Rezessivität für das gesamte Stoffinventar gilt. Wir prüften diese Frage, indem wir die verschiedenen homo- und heterozygoten Genotypen chromatographierten und die Quantität verschiedener Pterine bestimmten.

II. Zur Methodik

Alle Angaben beziehen sich auf Temperaturen von $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ und für Kulturen, die auf Standardfutter (Mais-Hefe-Zucker-Agar) gezüchtet wurden. Wir chromatographierten die Köpfe der Imagines 5 Tage nach dem Schlüpfen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Pigmente voll entwickelt. Nach der Methode von HADORN und MITCHELL (1951) wurde je ein lebensfrischer Kopf auf dem Startfleck des Chromatographiepapieres (Whatman Nr. 1) zerrieben und mit Propanol/2% NH_4OH (2:1) eindimensional chromatographiert. Für die Bestimmung der Pterinmengen wurde eine einfache Apparatur verwendet, die erlaubt, das emittierte Fluoreszenzlicht mit einer Photozelle direkt am trockenen Papier zu messen. Anderweitige Untersuchungen unseres Institutes haben gezeigt, daß für den Bereich der aufgetragenen Konzentrationen eine lineare Beziehung besteht zwischen der Pterin-Quantität und dem von der Photozelle gelieferten Strom.

Um die photolabilen Pterine zu schützen, wurde im Dunkelkasten chromatographiert.

III. Das berücksichtigte Stoffinventar

Geordnet nach steigenden R_f -Werten lassen sich nach Chromatographie in Propanol/Ammoniak aus Imaginalaugen folgende Pterinfraktionen aussondern:

a) Rote Augenfarbstoffe = *Drosopterine* (DP). Nach VISCONTINI, HADORN und KARRER (1957) handelt es sich hier um drei chemisch nahe verwandte Pterine (*Drosopterin*, *Isodrosopterin* und *Neodrosopterin*).

b) 2-Amino-6-oxypterincarbonsäure (8) = „*Pterincarbonsäure*“ (PC), (VISCONTINI, SCHOELLER, LOESER, KARRER und HADORN 1955).

* Ausgeführt mit Unterstützung der Karl Hescheler-Stiftung.

c) *Isoxanthopterin* (IX) (VISCONTINI et al. 1955). Da die Augen nur wenig Isoxanthopterin enthalten und der betreffende Fleck unmittelbar in den Xanthopterinfleck (s. unten) übergeht, haben wir in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet, das Isoxanthopterin gesondert zu erfassen. Es wurde vielmehr mit dem viel stärker vertretenen X-Pterin gemessen. Im übrigen scheint das Isoxanthopterin für unsere Problemstellung keine wesentliche Rolle zu spielen.

d) Ein blaugrün fluoreszierendes Pterin, das sich wie *Xanthopterin* verhält und von uns vorläufig als *X-Pterin* (X) bezeichnet wird.

Die Substanz hat in allen geprüften Chromatographier-Gemischen (Propanol/2% NH_4OH , 2:1; Methanol/2n NH_4OH , 70:30; Äthanol/Butanol/konz. NH_4OH /Wasser, 50:15:10:25; 15% wäßrige Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 3% wäßrige Lösung von NH_4Cl ; Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:5) die gleichen R_f -Werte wie synthetisches Xanthopterin. Die Lagen der Absorptions-Maxima und -Minima der eluierten Flecken stimmen außerdem mit denen des Xanthopterins sowohl in alkalischer (n/10 NaOH) als auch in saurer Lösung (n/10 HCl) überein.

Bei Verwendung der drei letztgenannten (sauren) Gemische erscheint nach Chromatographie des am Papier zerriebenen Kopfes kein blaugrün fluoreszierendes Pterin, sondern fast ausschließlich das gelbe Sepia-Pterin. Zugleich aufgetragenes Test-Xanthopterin ist gut sichtbar und hat einen deutlich vom Sepia-Pterin verschiedenen R_f -Wert. In den alkalischen Gemischen läßt sich das blaugrün fluoreszierende Pterin jedoch sofort darstellen. Chromatographiert man nun weiter in einem sauren Gemisch und senkrecht zur ersten Richtung, so zeigt das durch die Chromatographie in der ersten Richtung dargestellte blaugrün fluoreszierende Pterin die gleiche Wandergeschwindigkeit wie Xanthopterin; folglich beruht das Nichterscheinen des blaugrün fluoreszierenden Stoffes bei ausschließlicher Verarbeitung in saurem Milieu nicht darauf, daß es eventuell vom gelben Fleck überdeckt wird, sondern er bleibt möglicherweise im sauren Bereich an einen nativen Stoff gebunden oder wird erst durch Abbau eines anderen Pterins in alkalischem Milieu gebildet.

Über diesem X-Pterin liegt noch eine weitere blaugrün fluoreszierende Verbindung, die mit dem Xanthopterin nahe verwandt sein dürfte. Auch VISCONTINI, KÜHN und EGELHAAF (1956) fanden bei der Mehlmotte *Ephestia* neben dem Xanthopterin ein dem Xanthopterin sehr ähnliches Produkt.

Dieses Pterin wurde zusammen mit dem weit stärkeren X-Pterin gemessen. Mit dem Isoxanthopterin zusammen erscheinen diese beiden Stoffe in unseren Messungen als „Xanthopterin“-Komplex.

e) Ein gelbes Pterin, das wir als *Sepia-Pterin* (SP) bezeichnen möchten, weil es in der Mutante *sepia* in hohen Konzentrationen angereichert wird. Diese Substanz wurde von FORREST und MITCHELL (1954) isoliert. Sie wird im Licht langsam zu Pterincarbonensäure und Milchsäure abgebaut. Die Einzelheiten ihrer Konstitution sind jedoch noch weiter abzuklären (vgl. ZIEGLER-GÜNDER 1956).

f) Zwei himmelblau fluoreszierende Pterine (HB), die sich mit Propanol/Ammoniak kaum trennen lassen. Sie wurden von VISCONTINI, SCHOELLER, LOESER, KARRER und HADORN (1955) isoliert und als HB_1 und HB_2 bezeichnet. VISCONTINI et al. (1955) wie auch FORREST und MITCHELL (1955) haben HB_1 als 2-Amino-6-oxypterin identifiziert. Die Konstitution von HB_2 ist dagegen noch nicht abschließend klargelegt. Diese Verbindung ist stark photolabil und liefert unter Lichteinwirkung die Pterincarbonensäure.

Die HB-Pterine behandeln und messen wir im folgenden als Sammelfraktion. In allen Abbildungen und Tabellen, wie gelegentlich auch im Text, verwenden wir für die gemessenen Fraktionen die oben angegebenen Abkürzungen: DP, PC, X (inklusive Isoxanthopterin), SP und HB.

IV. Ergebnisse

1. Der Faktor *sepia* (*se*)

a) Die Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 1). Die Augen der Mutante *sepia* enthalten keine Drosopterine. Dagegen sind alle übrigen erfaßten Fraktionen gegenüber dem Wildtypus, wie Abb. 1 zeigt, mehr oder weniger stark vermehrt. Die entsprechenden Werte verhalten sich annähernd wie folgt: Für die Pterincarbonsäure (PC) wie 10:1, für den „Xanthopterinfleck“ (X) wie 8:1, für das Sepia-Pterin (SP) wie 20:1 und für die HB-Pterine (HB) wie 6:1. Die starke Erhöhung des gelben Pterins (SP) wurde bereits von HADORN und MITCHELL (1951) festgestellt und gab Anlaß zu den Untersuchungen von FORREST und MITCHELL (1954) und auch von HADORN u. ZIEGLER-GÜNDER (1958).

b) Die Manifestation von *se* im *se/+*-Genotypus (Abb. 1). In der Abb. 1 sind die Pterinmengen der männlichen F_1 -Bastarde aus der Kreuzung *se/se* $\times$ *+/+* aufgetragen. Für die verschiedenen Pterine ergeben sich folgende

Befunde: Im *se/+*-Bastard sind die roten Augenfarbstoffe (DP) gleich stark vertreten wie im Wildgenotypus. Soweit verhält sich das *sepia*-Allel scheinbar vollkommen rezessiv. Auch in den Mengen der Pterincarbonsäure und des Sepiapterins lassen sich keine gesicherten Unterschiede zwischen *+/+* und *se/+* nachweisen. Dagegen manifestiert sich das *sepia*-Allel stark im „Xanthopterinfleck“, wo wir bei *se/+* rund 4mal mehr Substanz als bei *+/+* finden. Diese Vermehrung betrifft nicht das schwach vertretene Isoxanthopterin (S. 236), sondern das X-Pterin, sowie das oben erwähnte, ihm ähnliche, unbekannte Pterin. Für die HB-Pterine ergibt sich bei *se/+* eine Verdoppelung gegenüber *+/+*.

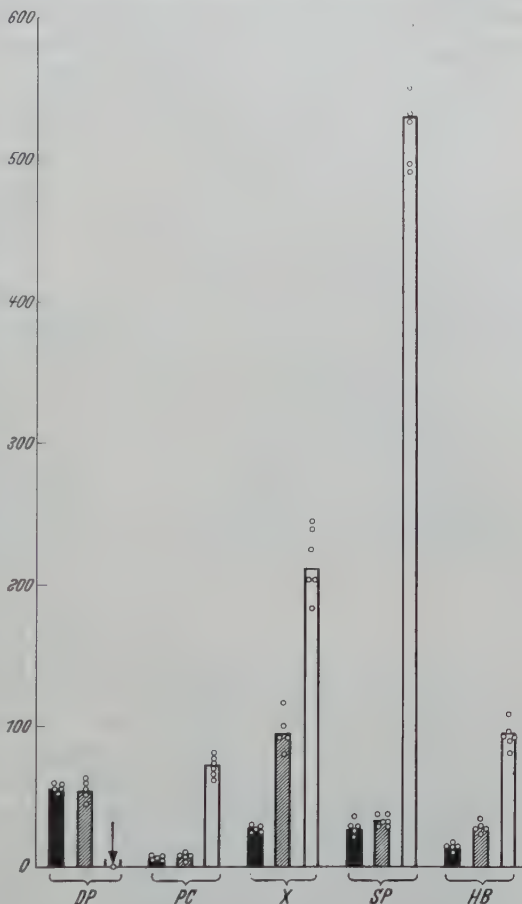


Abb. 1. Vergleich der Quantitäten verschiedener Pterinfraktionen aus *+/+* (ausgefüllte Säulen), *se/+* (schraffierte Säulen) und *se/se*-Köpfen (weiße Säulen). Die Meßpunkte (Kreise) beziehen sich auf die Stoffmenge aus je einem Imaginalkopf von 5 Tage alten Männchen. Die Höhe der Säulen gibt die Mittelwerte an. Ordinate: Fluoreszenzintensität. Übrige Erklärungen im Text, für Pterinsymbole vgl. S. 235/36

Diese Befunde gelten nach Beobachtungen und Messungen, die wir hier nicht im einzelnen belegen, auch für die reziproke Kreuzung $+/+ \times se/se$. Sie gelten ebenfalls für Bastarde, die aus Kreuzungen verschiedener *sepia*-Stämme hervorgingen. So manifestierten sich bei $+/se$ -Heterozygoten aus reziproken Kreuzungen, zu denen ein *se*-Stamm¹ verwendet wurde, der „nebenbei“ noch das Gen *ju* (*javelin*) enthielt, die gleichen Erhöhungen der Pterinfraktionen wie im Grundversuch der Abb. 1. Zwei weitere $+/se$ -Bastardserien wurde mit *se/se*-Tieren gezüchtet, die einerseits aus der Paarung der Hybriden $+/se \times +/se$, im anderen Fall aus der Kreuzung $dor^{+/-}; se^{+}/se \times dor^{+}/dor; se^{+}/se$ erhalten worden waren (*dor* = *deep orange*). Auch hier konnten bei den $+/se$ -Nachkommen die Befunde der Abb. 1 bestätigt werden, obschon nun gegenüber dem Grundversuch das genotypische Milieu des Bastards im Bestande der 1., 2. und 4. Chromosomen verändert war bzw. im 3. Chromosom neben *se* noch das Allel *ju* vorhanden war. Schließlich prüften wir auch die Frage, ob die *se*-Manifestation lediglich auf einer transitorischen Verschiebung in der Bildungsrate der Pterine beruhen könnte. Es zeigten sich in Heterozygoten aber dieselben *se*-Phäne, gleichgültig ob unmittelbar nach dem Schlüpfen, 2 Tage, 4 Tage später oder erst im Alter von 5 Tagen (Abb. 1) chromatographiert wurde.

Somit kann die Erhöhung in den beiden Pterinfraktionen bei *se*-Heterozygoten als eine unmittelbare Auswirkung des *se*-Allels interpretiert werden. Auf die Frage allfälliger Heterosis-Einflüsse werden wir später eingehen (S. 241).

2. Der Faktor *white* (*w*)

a) *Unterschiede gegenüber dem Wildtyp.* Nach dem 4.—5. Imaginaltage enthalten Abdomen und Augen von *white*-Individuen keine oder mindestens keine meßbaren Mengen an fluoreszierenden Pterinen. Doch beruht dieser Pigmentausfall nicht auf einer völligen Unfähigkeit zur Pterinsynthese. Wie HADORN (1954b) gezeigt hat, werden im Puppenkörper der *w*-Mutante zunächst ansehnliche Pterinmengen gebildet, die dann aber während der beiden ersten Imaginaltage völlig aus dem Körper verschwinden. Dabei lassen sich die Pterine als Exkrete im Meconium der frisch geschlüpften Fliegen in Konzentrationen nachweisen, die bedeutend höher sind als beim Wildtypus (HADORN und KÜRSTEINER 1955).

Nicht nur im *w*-Körper, sondern auch im *w*-Auge erscheint — wie beim Wildtyp — kurz nach der Verpuppung das Isoxanthopterin in fast normalem Ausmaß; überdies finden sich auch Spuren von HB und wohl auch von Sepiapterin. In der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung beginnt jedoch im Auge die Abnahme, und beim Schlüpfen ist kein fluoreszierendes Pterin mehr nachzuweisen (HADORN und ZIEGLER-GÜNDER 1958).

b) *Die Manifestation von w in +/w-Weibchen* (Abb. 2). Da $+/w$ -Heterozygote wildrote Augen zeigen, galt die Mutante *white* bisher als völlig rezessiv bzw. das w^{+} -Allel als völlig dominant. Chromatographie und fluorometrische Bestimmungen zeigen nun aber, daß zwischen $+/-$ - und $+/w$ -Weibchen wesentliche quantitative Unterschiede für Pterine bestehen.

¹ Dieser Stamm wurde uns in freundlicher Weise von Herrn Prof. LÜERS, Berlin-Buch, zur Verfügung gestellt.

Unsere Meßdaten sind in Abb. 2 aufgetragen. Wir beziehen dabei die bei den Weibchen festzustellenden Pterinmengen auf Mittelwerte, welche für mindestens ebenso viele hemizygot $+/-$ -Männchen bestimmt wurden, die aus den gleichen Kulturen wie die Weibchen stammen. Dieser „Männchen-Standard“ von 100% wird von $+/+$ -Weibchen für jede der berücksichtigten Pterinfractionen mit folgenden Mittelwerten knapp (SP) bis stark (DP) übertroffen: DP = 116%, X = 110%, SP = 104%, HB = 112%. Diese Unterschiede mögen zur Hauptursache auf geschlechtsspezifischen Größenunterschieden beruhen (HADORN 1957).

Werden nun aber die Pterine von $+/-w$ -Töchtern (aus $+/+ \times w/-$ -Kreuzungen) auf den Standard ihrer $+/-$ -Brüder bezogen, so ergeben sich durchaus andere geschlechtsspezifische Relationen, die wie folgt zu deuten sind: In heterozygoter Vertretung führt das w -Gen zu einer Verminderung in den Drosophterinen (DP = 9,5%) und im „Xanthopterin“-Komplex (X = 89%). Andererseits manifestiert sich w im $+/-w$ -Weibchen in einer beträchtlichen Zunahme des Sepiapterins (SP = 180%) und der HB-Pterine (HB = 150%). Wir werden auf S. 242 zeigen, daß diese Befunde nicht lediglich auf Bastard-Heterosis beruhen können. Wie bei der Kreuzung $se \times +$ (S. 237), scheidet auch eine nur transitorische Verschiebung in der Bildungsrate der Pterine aus, da die oben geschilderte Auswirkung des w -Allels sowohl kurz nach dem Schlüpfen, als auch im Alter von 2—5 Tagen festgestellt werden konnte. Durch die Chromatographie wurden vielmehr echte, vom w -Locus bedingte „Dominanzphäne“ aufgedeckt.

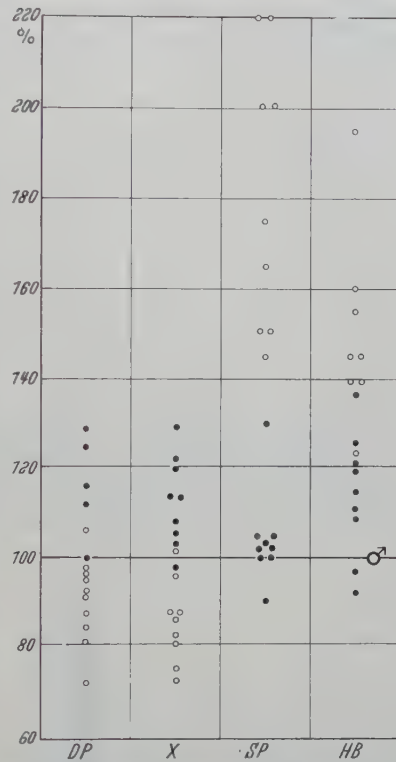


Abb. 2. Relative Pterinmenge (Ordinate) von $+/+$ -Weibchen (●) und von $+/-w$ -Weibchen (○), je bezogen auf die Mittelwerte ihrer hemizygoten $+/-$ -Brüder (100% -Niveaulinie). Die Meßpunkte beziehen sich auf die Chromatographieflecken, gewonnen aus je 1 Kopf. Pterinsymbole vgl. S. 235/36

3. Analyse kombinierter Genotypen mit *sepia* und *white*

a) Genotypen, die Drosophterine bilden. Kreuzt man se -Weibchen mit w -Männchen, so sind die Augen der Nachkommen rot, da in der Kombination $+/-w$; $se/+$ bzw. $+/-$; $se/+$ die Drosophterine, wenn auch in vermindertem Maß (S. 240), gebildet werden können. Es fragt sich nun, wie sich hier eine gleichzeitige Wirkung der Faktoren *sepia* und *white* auf die übrigen Pterine gestaltet.

α) Der Einfluß des w -Allels (Abb. 3). Heterozygote $se/+$ -Weibchen aus der Kreuzung $se \times +$ bilden wie auch beim Wildtyp (vgl. S. 239) stets mehr Pterine als die Männchen. Ersetzt man ein w^+ -Allel durch ein w -Allel und vergleicht man die $+/-w$; $se/+$ -Weibchen mit ihren $+/-$; $se/+$ -Brüdern, so stellt man den gleichen

Einfluß von w fest, wie bei der Kreuzung $+ \times w$ (Abb. 3). Durch das w -Allel werden die Drosopterine sowie der „Xanthopterin“-Komplex vermindert, wäh-

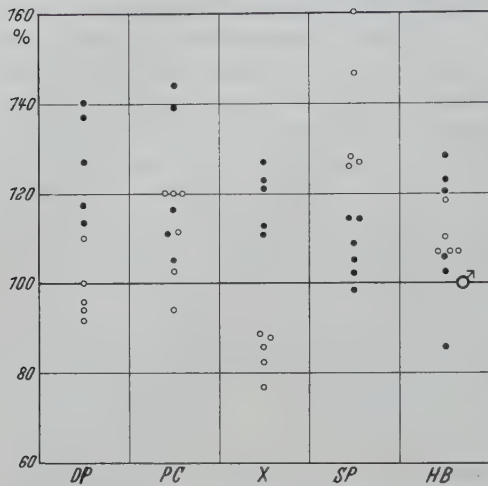


Abb. 3. Relative Pterinmengen je Kopf (Ordinate) von $+/+; +/se$ -Weibchen (●) und von $+/w; +/se$ -Weibchen (○), bezogen auf den Mittelwert ihrer $+/+; +/se$ -Brüder (100 %-Niveaulinie). Pterinsymbole nach S. 235/36

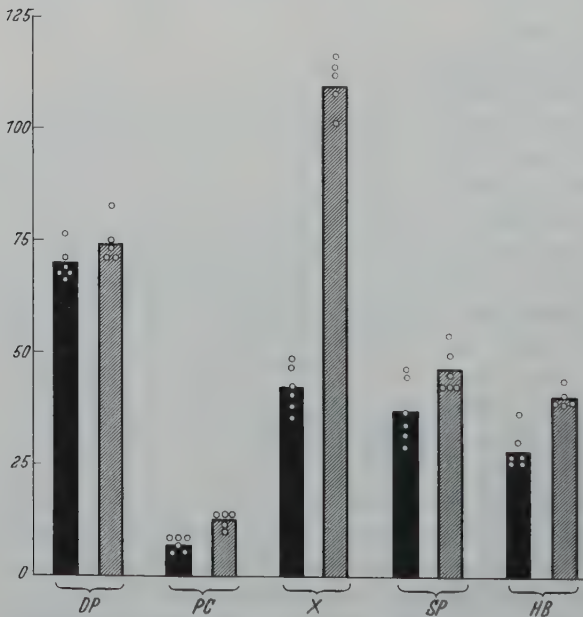


Abb. 4. Mittlere Pterinmengen (Ordinate) vergleichsweise für Weibchen der Genotypen $+/w; +/+$ (schwarze Säulen) und $+/w; +/se$ (schraffierte Säulen). Die einzelnen Meßwerte (je Kopf) sind mit ○ angegeben. Pterinsymbole nach S. 235/36

rend das Sepiapterin stark vermehrt ist. Für HB ließ sich hier kein statistisch gesicherter Einfluß feststellen. Die Carbonsäure, die bei der Kreuzung $+ \times w$ wegen zu geringer Menge nicht in Betracht gezogen werden konnte, erscheint schwach reduziert.

β) Der Einfluß des se -Allels (Abb. 4). Wir vergleichen nun bei allen heterozygoten $w/+$ -Weibchen die Pterinmengen der Fliegen mit oder ohne se -Allel. In Übereinstimmung mit den Befunden aus der Kreuzung $se \times +$ (Abb. 1), stellen wir fest, daß die Heterozygotie für se sich sehr stark bzw. deutlich nur im „Xanthopterin“-Komplex und in

den HB-Pterinen auswirkt. Die z. T. nicht gesicherten Erhöhungen der übrigen Pterine mögen auf Heterosiseffekten beruhen (S. 242). Heterosis dürfte auch dazu geführt haben, daß die absoluten Meßwerte für DP im Vergleich zu Abb. 1 relativ hoch sind, obschon nach Abb. 2 in diesen beiden Stoffgruppen eine Verminderung infolge Einwirkung des w -Allels zu erwarten ist. Jedenfalls steht fest, daß ein heterozygot vertretenes se -Allel seine spezifische Wirkung ausübt, gleichgültig, ob in der X-Chromosomen eine $+/+$ oder eine $+/w$ -Konstitution vorliegt.

b) Genotypen, die keine Drosopterine bilden. Weib-

chen, die das w -Allel enthalten, jedoch für se homozygot sind, wurden dadurch gewonnen, daß die von Kreuzungen gelieferten Hybriden ($w^+/w; se^+/se$ bzw. $w^+/-$

se^+/se) weiter miteinander gepaart wurden. Dadurch erhalten wir in jeweils $1/12$ der F_2 -Generation für se homozygote, für w^+ heterozygote Weibchen (w^+/w ; se/se) und ebenfalls für se homozygote, für w^+ jedoch hemizygoten Männchen ($w^+/-$; se/se).

Der grundlegende Unterschied zu den unter 3a geschilderten Befunden bzw. zu den Nachkommen der Kreuzung $+ \times w$ besteht nun darin, daß in dem System w^+/w ; se/se genau wie bei w^-/w^- ; se/se kein rotes Pterin gebildet wird. Wie wirkt nun das w -Allel, wenn bereits ein anderes Gen die Drosophterinfärbung verhindert?

Vergleicht man $+/+$; se/se -Weibchen mit $+/-$; se/se -Männchen, so finden wir wie beim Wildtyp (Abb. 2) auch hier stets einen Mehrgehalt der Weibchen an Pterinen (Abb. 5 zeigt diese Werte, bezogen auf den mit 100% eingesetzten Durchschnitt der Männchen). Die für w heterozygoten Weibchen zeigen nun, verglichen mit ihren für w^+ hemizygoten Brüdern, eine deutliche Reduktion fast sämtlicher Pterine; einzig das Sepiapterin zeigt keinen statistisch zu sichernden Unterschied. Wir haben somit wieder eine spezifische, reduzierende Wirkung des nur scheinbar rezessiven w -Allels: Die Augen der w^+/w ; se/se -Weibchen sind braun, wie diejenigen des Genotyps w^+/w^+ ; se/se .

Vergleichen wir nun aber die Wirkung des w -Allels in heterozygoter Vertretung einmal nach Abb. 2 in einem se^+/se^+ -Genotypus und nach Abb. 5 in einem se/se -Genotypus, so stellen wir zu-

nächst eine für beide Versuchsgruppen gleichsinnige Wirkung der $+/w$ -Heterozygotie für den „Xanthopterin“-Komplex und annähernd auch für die Sepiapterine fest. Dagegen wirkt das w -Allel auf die HB-Pterine deutlich verstärkend in der Kombination der Abb. 2 und ebenso deutlich reduzierend in der Kombination der Abb. 5. Diese Diskrepanz mag darauf beruhen, daß bei Genotypen, die Drosophterine bilden können (Abb. 2), eine Verstärkung der HB-Pterine deshalb eintreten muß, weil das eingeführte w -Allel die Bildung der roten Augenfarbstoffe beeinträchtigt. Bei Genotypen, die keine Drosophterine synthetisieren, fehlt offenbar die entsprechende stoffliche Grundlage, auf der die Heterozygotie für w angreifen kann. Somit würde ein se/se -System einem heterozygot vertretenen w -Allel eine neue Manifestationsmöglichkeit verschaffen.

4. Beteiligung von allgemeinen Heterosiswirkungen

Bei den von uns verwirklichten Versuchsanordnungen stellt sich überall die Frage, ob und in welchem Ausmaße die rezessiven Allele se und w sich in heterozygoter Vertretung auswirken. Es wurden daher die Pterinmengen von $+/+$ - mit

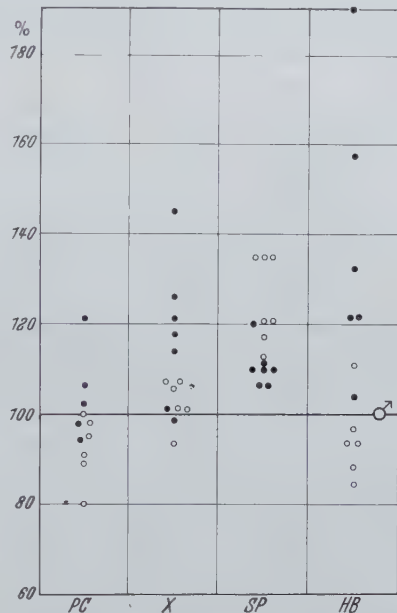


Abb. 5. Relative Pterinmengen je Kopf (Ordinate) von $+/+$; se/se -Weibchen (●) und von $+/w$; se/se -Weibchen (○), bezogen auf den Mittelwert ihrer $+/-$; se/se -Brüder (100% Niveaulinie). Pterinsymbole nach S. 235—36

$+/se$ - bzw. $+/w$ -Genotypen verglichen. Die festgestellten Unterschiede dürfen nun nicht ohne weiteres als Auswirkungen der rezessiven se - und w -Allele interpretiert werden. Durch die Paarung der Ausgangsstämme werden Bastardgenotypen kombiniert, in denen nach zahlreichen Erfahrungen der Genetik allgemeine Heterosiswirkungen manifestiert werden können. Zu erwarten ist vor allem eine Zunahme der Körpergröße und damit auch eine Steigerung der von uns gemessenen Stoffmengen.

Wir versuchten das Ausmaß solcher Wirkungen an der in Abb. 6 dargestellten Vergleichsserie festzustellen. Wir sehen, daß alle Pterinfraktionen bei den

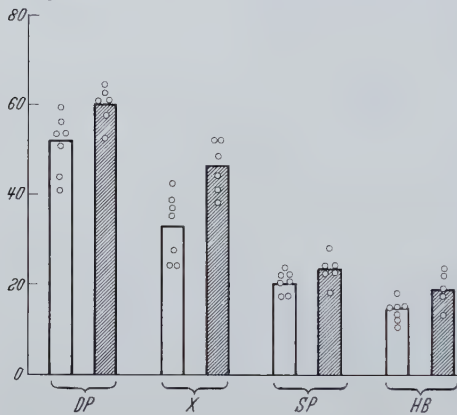


Abb. 6. Mittlere Pterinmengen (Ordinate) vergleichsweise für Männchen eines Wildstammes (+/-) (weiße Säulen) und für F_1 -Männchen (+/-) aus der Kreuzung $+/+ \times w/-$ (schraffierte Säulen). Einzelne Meßwerte (o) je Kopf. Pterinsymbole nach S. 235—36

$+/-$ -Männchen, die als F_1 aus der Kreuzung $+/+ \times w/-$ hervorgingen, gegenüber den Meßwerten für die $-/-$ -Männchen des Wildstammes mehr oder weniger stark erhöht sind. Diese positiven Heterosiseffekte können Steigerungen bis über 30% zur Folge haben; doch erreichen sie bei weitem nicht jene Erhöhungen der Pterinmengen, wie sie bei $se/+$ -Heterozygoten für den „Xanthopterin“-Komplex festgestellt wurden (Abb. 1 und 4). Ebensowenig kann die starke Steigerung des Sepiapterins und der HB-Fraktion bei $+/w$ -Weibchen (gegenüber $+/+$) nur auf Heterosis beruhen. Entscheidend ist nun aber die Tatsache, daß in $+/w$ -Genotypen neben der starken Erhö-

hung von SP und HB eine besonders deutliche Verminderung der Drosopterine und des „Xanthopterin“-Komplexes eintritt (Abb. 2). Solch spezifische und gegensinnige Wirkungen können nicht auf allgemeiner Heterosis beruhen, sonst müßten sie auch bei Bastarden auftreten, die das w -Allel nicht enthalten (Abb. 1, 4, 6). Die beobachteten starken Unterschiede in den Pterinfraktionen zwischen den Wildgenotypen und den für die Allele w bzw. se heterozygoten Tiere sind daher als locuspezifische Auswirkungen der Mutationsschritte $w^+ \rightarrow w$ und $se^+ \rightarrow se$ aufzufassen. Diese Wirkungen sind bei Bastarden verschiedener Kombinationen immer nur dann festzustellen, wenn die w - oder se -Allele heterozygot vertreten sind.

V. Allgemeine Ergebnisse und Zusammenfassung

Aussagen über Dominanz und Rezessivität werden meist auf Grund auffälliger morphologischer oder physiologischer Phäne gewonnen. Dabei bleiben allfällige biochemische Wirkungen „rezessiver“ Gene in heterozygoter Vertretung unbeachtet. Die vorliegenden Untersuchungen beweisen, daß sich solche Erbfaktoren, auch wenn ihnen ein „dominantes“ Wildallel gegenübersteht, doch im Stoffinventar quantitativ und spezifisch auswirken können. Wir zeigten, wie die Mengen verschiedener Pterine in Heterozygoten durch die Gene w bzw. se beeinflußt werden. Nicht näher bestimmte Besonderheiten in Chromatogrammen

von *Drosophila*-Genotypen, die für rezessive Faktoren heterozygot waren, wurden bereits von BUZZATTI-TRAVERSO (1943) angegeben. Sodann haben SAWIN und GLICK (1943) gezeigt, daß beim Kaninchen die Bildung von Atropin-esterase durch ein scheinbar rezessives Gen beeinflußt wird.

Unsere Untersuchung kombinierter Genotypen führte zu einem weiteren interessanten Befund: Wenn ein heterozygot vertretenes *w*-Allel in einen *se/se*-Genotypus eingeführt wird, so verändert sich seine Wirkungsmöglichkeit gegenüber derjenigen, die auf einem $+$ $+$ - oder $+/se$ -Hintergrund manifest wird. Dies bedeutet, daß Heterozygotie-Effekte „rezessiver“ Gene maßgebend durch den Restgenotypus beeinflußt werden können.

Bei einem Versuch, aus den vorliegenden Kreuzungen Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Pterinfraktionen zu finden, ist zu berücksichtigen, daß die hier nach alkalischer Chromatographie erfaßten Pterine zum Teil Abbauprodukte eines oder mehrerer Pterine von bisher unbekannter Konstitution sind. Dies konnte einleitend für das wahrscheinlich mit Xanthopterin identische X-Pterin bewiesen werden. Für andere Pterine erscheint auf Grund noch unveröffentlichter Versuche eine solche Genese wahrscheinlich.

Die stofflichen Zusammenhänge sind im einzelnen keineswegs einfach und sie sind bei verschiedenen Mutanten verschiedenartig korreliert (HADORN 1956). Bei der Mutante *sepia* kommt es zur Anhäufung des gelben Sepiapterins. Selbst wenn dieser Stoff als Vorstufe der bei *se* nicht gebildeten Drosopterine aufgefaßt wird (DANNEEL und ESCHRICH 1956), so wäre damit das Wirkungsmuster des *se*-Faktors noch keineswegs ausreichend geklärt, denn bei *se* kommt es überdies noch zur Vermehrung anderer Pterine. Immerhin läßt sich vermuten, daß auf dem Syntheseweg der roten Drosopterine das Sepiapterin und ein HB-Pterin als Bausteine verwendet werden; denn diese Stoffe werden bei Anwesenheit eines *w*-Allels in Heterozygoten angehäuft. Das *w*-Allel schwächt wohl den im Wildtyp von den „niedrigen“ Bausteinen zu den roten Pterinen führenden Syntheseweg, wenn es auch (selbst bei homozygoten *w*-Tieren) prinzipiell die Synthese des Pteringerüstes erlaubt (HADORN und KÜRSTEINER 1955). Ist jedoch dieser Syntheseweg durch die Anwesenheit eines homozygoten *se*-Allelpaares bereits vor Erreichen der roten Endstufe „geschwächt“, so bewirkt das *w*-Allel im Heterozygoten *w⁺/w*; *se/se*-Individuum möglicherweise eine weitere „Brem-
sung“ des Aufbauweges, so daß jetzt alle nach Chromatographie erfaßten Pterinfraktionen erniedrigt werden.

Eine weitergehende Analyse der an der Pterinsynthese beteiligten Genwirkungen wird erst möglich, wenn die chemische Natur der nativen Augenpterine genügend bekannt ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Mittels Papierchromatographie und Fluoreszenzmessungen wurden bei verschiedenen homo- und heterozygoten Genotypen von *Drosophila melanogaster* die Quantitäten der hauptsächlichsten Pterine bestimmt, die aus den Augen von 5 Tage alten Imagines isoliert werden können.

2. Die bezüglich der sichtbaren Augenfarbe rezessiven Gene *sepia* (*se*) und *white* (*w*) manifestieren sich (locusspezifisch) in heterozygoter Vertretung teils

in einer Vermehrung, teils in einer Verminderung einzelner Komponenten des Pterinininventars.

3. Das *se*-Allel führt in $+/se$ -Genotypen zu einer Vermehrung des X-Pterins (Xanthopterin?) und der HB-Pterine. Dabei wirkt das *se*-Allel in gleicher Richtung wie im *se/se*-Genotypus; dies führt zu biochemisch intermediären Mustern, die zwischendenjenigen von $+/+$ und *se/se* stehen.

4. Das *w*-Allel bewirkt in $+/w$ -Genotypen eine Reduktion der roten Augenpigmente (Drosopterine) und des X-Pterins (Xanthopterin?), verstärkt aber andererseits die Bildung des Sepiapterins und der HB-Pterine.

5. Die heterozygote Wirkung der Allele *se* und *w* setzt sich auch in kombinierten Genotypen in locuspezifischer Weise durch; dabei werden einzelne zusätzliche Pleiotropiewirkungen manifest.

6. Die Auswirkung der heterozygot vertretenen Allele läßt sich von allgemeinen Heterosiseffekten abgrenzen.

Summary

1. By using paper chromatography and measurement of fluorescence it could be proved that the "recessive" genes *sepia* (*se*) and *white* (*w*) of *Drosophila melanogaster* influence considerably the quantities of pteridines in the eyes of heterozygous genotypes ($+/se$ and $+/w$).

2. The *se* allele causes in $+/se$ genotypes an increase of X-pterine (xanthopterin?) and of the HB-pterines.

3. The *w* allele causes in $+/w$ genotypes a reduction in the quantity of the drosopterines (red eye pigments) and the X-pterine (xanthopterin?) but increases the content of the „sepia-pterine“ and HB-pterines.

4. Measurements of different eye pteridines in combined genotypes show that the observed effects of the factors *se* and *w* are of a genuine locus-specific nature.

Literatur

- BIZZATI-TRAVERSO, A.: Paper chromatographic patterns of genetically different tissues, a contribution to the biochemical study of individuality. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **39**, 376—391 (1953). — DANNEEL, R., u. B. ESCHRICH: Untersuchungen über den gelben Augenfarbstoff der Mutante „sepia“ von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturforsch.* **11b**, 105—110 (1956). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: Pteridines from *Drosophila*. *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5658—5662 (1954). — Pteridines from *Drosophila*. Isolation and identification of three more pteridines. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4865—4869 (1955). — HADORN, E.: Approaches to the study of biochemical and developmental effects of mutations. *Caryologia (Pisa)*, Suppl. **6**, 326—337 (1954a). — Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. *Experientia (Basel)* **10**, 483—484 (1954b). — Patterns of biochemical and developmental pleiotropy. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 363—373 (1956). — Über die Bildung der roten Augenpigmente von *Drosophila melanogaster* im Transplantaten. *Rev. suisse Zool.* **64**, 317—325 (1957). — HADORN, E., u. R. KÜRSTEINER: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. *Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* **30**, 494—498 (1955). — HADORN, E., and H. K. MITCHELL: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **37**, 650—665 (1951). — HADORN, E., u. I. ZIEGLER-GÜNDER: Untersuchungen zur Entwicklung, Geschlechtsspezifität und phänogenetischen Autonomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von *Drosophila melanogaster*. *Z. indukt. Abstamm.- u.*

Vererb.-Lehre **89**, 221—234 (1958). — SAWIN, P. B., and D. GLICK: Atropinesterase, a genetically determined enzyme in the rabbit. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **29**, 55 (1943). — VISCONTINI, M., E. HADORN u. P. KARRER: Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*: die roten Augenfarbstoffe. Helv. chim. Acta **40**, 579—585 (1957). — VISCONTINI, M., A. KÜHN u. A. EGELHAAF: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephesia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 501—504 (1956). — VISCONTINI, M., M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER u. E. HADORN: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. Helv. chim. Acta **38**, 397—401, 1222—1224, 2034—2035 (1955). — ZIEGLER-GÜNDER, I.: Untersuchungen über die photolabilen Pterine in der Haut der Amphibien und in den Augen von *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **11b**, 493—500 (1956).

Professor Dr. E. HADORN, Zoologisch vergl.-anatomisches Institut
der Universität Zürich (Schweiz), Künstlergasse 16

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN TRANSLOKATIONS- HETEROZYGOTEN VON *PETUNIA HYBRIDA**

Von

ILSE MÜLLER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Dezember 1957)

RICK (1943) und WELZEL (1954) erwähnen das Auftreten von Translokationsheterozygoten (T.H.) in Bestrahlungsnachkommenschaften von *Petunia*. Das cytologische Verhalten dieser Mutanten wurde nicht näher untersucht. WELZEL gibt an, daß sie annähernd semisteril sind. Diese Semisterilität ergibt sich aus der zufälligen Verteilung der Ringchromosomen in Anaphase I. T.H. dieses Typus eignen sich gut zur Identifizierung von Chromosomen, denn hier läßt sich ein äußeres Merkmal wie die Semisterilität einem bestimmten, cytologisch zu definierenden Chromosom zuordnen. Die zahlreichen Arbeiten an *Mais* und *Pisum* beweisen die Brauchbarkeit dieser Methode. Andererseits gibt es Gattungen, in deren T.H. die Ringchromosomen eine regelmäßig alternierende Verteilung aufweisen, die zu lauter fertilen Gameten führt. Wegen dieser Fertilität ist bei diesen Formen die oben genannte Methode nicht anwendbar. Es gehören hierzu *Oenothera*, *Triticum*, *Rhoeo* u. a. Mit *Oenothera* hat *Petunia* die Gliederung der Chromosomen in ein heterochromatisches Mittelstück und euchromatische Enden gemeinsam, mit *Zea Mays* die Semisterilität der T.H. Aufgabe der folgenden Arbeit ist die Untersuchung des meiotischen Verhaltens von *Petunia*-Translokationsheterozygoten und die Zuordnung zu einem der beiden Verteilungstypen. Außerdem wird der Versuch unternommen, den Selbststerilitätsfaktor S, der bei *Petunia* in einer ganzen Anzahl von Allelen bekannt ist (WELZEL 1936, MATHER 1944, STRAUB 1946), mit Hilfe dieser T.H. zu lokalisieren.

Material und Methode

Als Ausgangsmaterial zu der vorliegenden Arbeit dienten zwei Klone von *Petunia hybrida* hort., Gruppe *media vulgaris*. Sie stammen aus den Kulturen von Herrn Prof. Dr. J. STRAUB. Sie sind seit Jahren streng selbststeril. T₂AE enthält homozygot das Allel S₂, T₂U, ebenfalls homozygot, S₃.

Zur Auslösung von Chromosomen- und Genmutationen wurde reifer Pollen von beiden Klonen einer Röntgenbestrahlung von 10000, 20000 und 30000 r ausgesetzt. Innerhalb des Zeitraums von 1 Std bis 14 Tagen nach der Bestrahlung wurden die Kreuzungen T₂U × T₂AE (bestrahlt) und T₂AE × T₂U (bestrahlt) an jungen kastrierten Blüten durchgeführt. Aus der X₁ las ich die chromosomalen Mutanten aus und bestimmte von allen zur Blühreife gekommenen Pflanzen die Pollenletalität. In einer Karmin-Essigsäure-Aufschwemmung lassen sich sehr leicht die fertilen (groß, rund) von den letalen (geschrumpft, oval) Pollenkörnern unterscheiden. WELZEL (1954) wies nach, daß diese Methode im Vergleich mit Pollenschlauchkulturen richtige Werte ergibt.

Die cytologischen Präparate wurden bis auf wenige Ausnahmen nach der Karmin-Essigsäure-Methode hergestellt. Als Fixierungsmittel diente ein Alkohol-Eisessig-Gemisch (3:1).

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

Zur Sichtbarmachung der sekundären Einschnürungen, die in KES-Präparaten nur selten zu erkennen sind, wurden die Antheren 2 Std in La Cour fixiert und dann nach der Nuclealquetschmethode (HEITZ 1936) weiterverarbeitet.

Mikroskop: Leitz Laborlux, Okul. 6, 10, Obj. 42, 63, Öl 100.

Mikrophotographien: Zeiss Ultraphot.

Die statistische Beurteilung der Spaltungszahlen erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Testes (MATHER 1951).

Experimenteller Teil

I. Das Ausgangsmaterial

Petunia ist ein in der cytologischen Literatur nicht unbekanntes Objekt: KOSTOFF (1930, 1938), KOSTOFF und KENDALL (1931), MARTHALER (1936), LEVAN (1937a und b) u. a. befassen sich mit Studien über die Chromosomenzahl. *Petunia* besitzt danach diploid 14 Chromosomen. Sie sind sehr stark heterochromatisch. MARTHALER (1936) stellte ein Idiogramm der mitotischen Chromosomen auf. Hier sei nur angeführt, daß die Größenunterschiede der Chromosomen sehr gering sind, und daß unsere Rasse — im Gegensatz zu der von MARTHALER untersuchten Sippe — nicht 2 sondern nur 1 Paar SAT-Chromosomen enthält.

Über den Ablauf der Meiose findet man bei WEIZEL (1954) eine ausführliche Beschreibung. Vollständige Pachytänanalysen sind wegen der regelmäßigen starken Verknäuelung der Chromosomen nicht möglich. In der Diakinese und Metaphase werden 7 Bivalente gebildet. Die Anaphase verläuft ohne Störungen, so daß die relativ hohe Pollenletalität von 12,4% bei T_2AE und von 19,6% bei T_2U cytologisch nicht zu erklären ist.

Von dem Genbestand der beiden Ausgangsrassen war nur das Selbststerilitäts-gen bekannt: T_2AE mit S_2 , T_2U mit S_3 , beide homozygot. Die Pflanzen erwiesen sich bei allen Selbstungen als vollkommen selbststeril. Bei beiden Klonen ist es aber möglich, durch Knospenselbstungen, die allerdings bei T_2AE sehr schwer zu erreichen sind, Selbstungsnachkommen zu erhalten.

Ergebnis der Selbstungen. a) T_2U -Selbstung. Das auffallendste spaltende Merkmal ist die Pollenfarbe. Der T_2U -Pollen hat im reifen Zustand eine blaß-gelbe, fast weiße Farbe.

Unter den Nachkommen finden sich einige Pflanzen mit goldgelbem Pollen. Der Farbunterschied ist eindeutig.

Tabelle 1. Spaltung der Pollenfarbe in einer T_2U -Selbstung

	Weiß	Gelb	χ^2 3:1	P
$T_2U \times T_2U$	16	6	0,0606	0,8

Trotz der geringen Anzahl läßt sich eine 3:1-Spaltung sehr wahrscheinlich machen: Weiß (W) ist dominant über gelb (w) (Tabelle 1). T_2U ist also heterozygot in bezug auf die Pollenfarbe (Ww).

Neben der Spaltung der Pollenfarbe ist noch die Spaltung der Pollenletalität bedeutsam. Der Anteil des letalen Pollens schwankt in der Nachkommenschaft von 5—90%, bei der Mehrzahl der Pflanzen liegt er zwischen 30 und 40% (Abb. 1).

b) T_2AE -Selbstung. Die Pollenfarbe spaltet nicht auf: Die gesamte Nachkommenschaft hat weiße Pollen. Demnach kommt T_2AE die Konstitution WW zu. Die Pollenletalität bleibt hinter der T_2U -Nachkommenschaft zurück. Sie schwankt zwischen 10 und 50%. Das Maximum liegt zwischen 20 und 30% (Abb. 1).

Ergebnis der Kreuzung der beiden Ausgangsklone. Die F_1 -Pflanzen der Kreuzung $T_2U \times T_2AE$ (und reziprok) haben weißen Pollen. Die Schwankungen in der Pollenletalität sind bei weitem nicht so stark wie bei den Selbstungen.

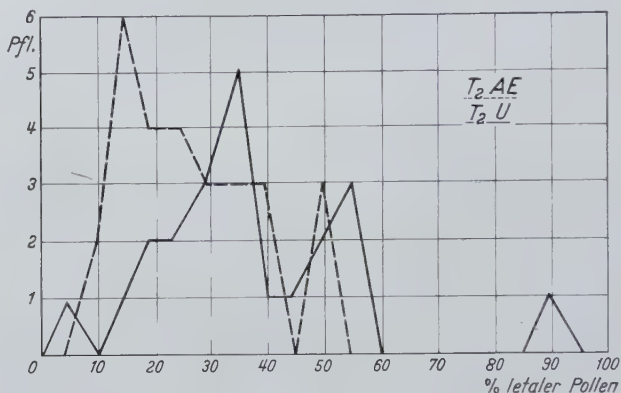


Abb. 1. Pollenletalität von T_2U - und T_2AE -Selbstungen

In bezug auf das S-Gen erwiesen sich alle F_1 -Pflanzen als heterozygot.

In der durch Knospenselbstungen erhaltenen F_2 spalten die beiden Gene S und W erwartungsgemäß auf (Tabelle 2).

Die S-Spaltung in der F_2 (MV) entspricht mit einem χ^2 von 0,272 ($p = 0,9$ bis $0,8$) vollkommen der Erwartung, ebenfalls die Spaltung der Pollenfarbe ($\chi^2 = 0,44$, $p = 0,7 - 0,5$).

Tabelle 2. Spaltung der Gene S und W in der F_2 der Kreuzung $T_2U \times T_2AE$

P	$S_3S_3 Ww \times S_2S_2 WW$				
F_1	$1 S_2S_3 WW \mid 1 S_2S_3 Ww$				
F_2	L I MV				
	S_2S_2	S_2S_3	S_3S_3	Weiß	Gelb
L I	4	6	4	14	—
MV	9	17	7	26	11

Testet man die beiden spaltenden Genpaare (S_2S_3 , Ww) auf Koppelung, so läßt sich eine freie Rekombination wahrscheinlichmachen. Die Pollenletalität der F_2 -Pflanzen kann bis zu 50% ansteigen; sie bewegt sich durchschnittlich zwischen 20 und 30%.

Die Gene für Pollenfarbe und Selbststerilität verhalten sich in dem unbehandelten Material der Erwartung entsprechend. Hinsichtlich der Pollenletalität lassen sich keine mendelnden Verhältnisse auffinden.

II. Die Translokationsheterozygoten

a) *Cytogenetik.* Lange Zeit konnte unter den hochgradig sterilen Pflanzen des Bestrahlungsmaterials keine einzige T.H. gefunden werden. Es kamen zwar gelegentlich Pflanzen vor, bei denen einzelne PMZ ringähnliche Konfigurationen aufwiesen, die Mehrzahl der PMZ aber zeigte nur Bivalente und Univalente. Wegen ihrer Seltenheit wurden die Verkettungen als zufällige Zusammenlagerungen betrachtet und die Pflanzen als normal klassifiziert. Schließlich fiel ein Exemplar auf, das in der Mehrzahl seiner PMZ 4-Ringe oder -Ketten (Abb. 2), daneben aber auch Zellen ohne Verkettungen aufwies. Es handelte sich eindeutig um eine T.H., deren 4-Ring sich nur unregelmäßig manifestierte. Im

Laufe der Zeit wurden noch 10 weitere T.H. gefunden: 1C₁, 7R, 12T, 12W, 13S, 17M, 19I, 20X, 83D₂, 85M₁, 99H. Bei keiner einzigen von diesen Pflanzen, auch nicht unter deren Nachkommen, traten die 4-Ringe regelmäßig in den PMZ auf. Der Prozentsatz ihrer Manifestation ist bei den einzelnen Exemplaren ganz verschieden. Einen mittleren Wert stellt die Auszählung der Diakinese-Konfiguration von 83D₂ dar:

62 PMZ ohne 4-Ring: 14 PMZ mit Ring bzw. Kette.

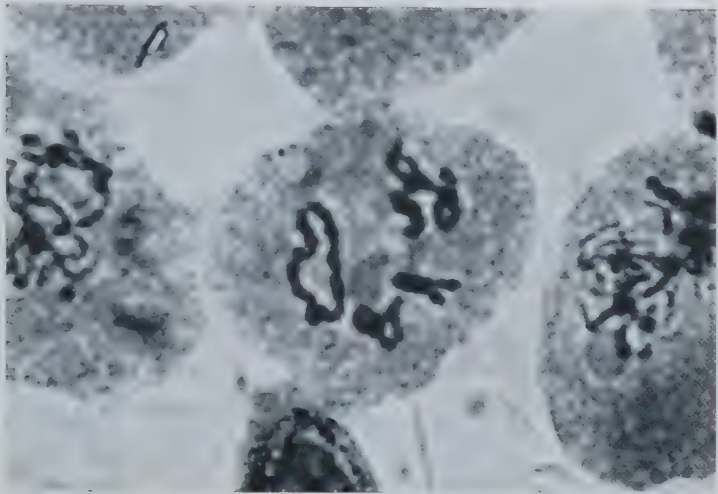


Abb. 2. 4-Ring in der Diakinese, 2000 ×

Als Restfigur von einem 4-Ring ist gelegentlich noch eine 3-Kette mit einem Univalent vorhanden (Abb. 3).

Die Identifikation der Ringe in der Metaphase ist sehr unsicher. Es wurden aber sowohl Zickzackanordnungen, die zu fertilen Gameten führen, gefunden als auch offene Ringe, die eine nichtwechselseitige Verteilung anzeigen. Die in einem besonders günstigen Fall mögliche Auszählung zeigt die Bevorzugung der wechselseitigen Lage (s. Tabelle 10).

Das gehäufte Auftreten von Tetraden mit ungleichen Chromosomenzahlen weist oft auf das Vorhandensein einer reziproken Translokation hin. Da Anaphasen, in denen eine solche falsche Verteilung am ehesten auffällt, in unseren Fixierungen sehr viel häufiger waren als Diakinesen, war uns der Zusammenhang zwischen diesen beiden Erscheinungen

Tabelle 3. Chromosomenverteilung in Anaphase I der T.H. 17 M

	7:7	8:6	Summe	% 8:6
1. und 2. Anthere .	41	16	57	28%
3. und 4. Anthere .	36	8	44	18%
Summe	77	24	101	24%

sehr wertvoll. Er ist zu verstehen aus dem Zusammenbleiben gepaarter Chromosomen in der Anaphase. Dies tritt bekanntlich bei Verkettungen von Chromosomen öfter auf als bei normalen Bivalenten. 17M, eine T.H., zeigt diese Anormalität z. B. in sehr starkem Maße (Tabelle 3).

In der X_1 fanden sich nur 4-Ring-Formen, d. h. Pflanzen mit einer einzigen reziproken Translokation, höhere Verkettungen waren nicht aufzufinden. Will man zu 6- oder 8-Ringen kommen, so müssen diese aus den 4-Ring-Pflanzen durch Kreuzungen aufgebaut werden. Es wurden darum alle vorhandenen 4-Ring-Pflanzen miteinander gekreuzt und der größte Teil ihrer Nachkommen cytologisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Kreuzungen in bezug auf das cytologische Verhalten sind in Tabelle 4 dargestellt. Aus dieser Tabelle ist folgendes zu ersehen:

Tabelle 4. Vererbung der Translokation bei T.H.-Kreuzungen

Prot.-Nr.	Kreuzung	Anzahl Pflanzen mit				Summe
		7 Bivalenten	1 4-Ring	6-Ring	2 4-Ringen	
C I, II	1 C_1 $\times$ 12 T	6	11	—	—	17
D I	7 R $\times$ 12 W	6	6	—	—	12
E IV	12 T $\times$ 1 C_1	8	7	—	—	15
G	12 W $\times$ 7 R	1	9	2	—	12
H II	12 W $\times$ 7 R	5	5	—	—	10
H III	1 C_1 $\times$ 12 W	3	5	1	—	9
J I	12 W $\times$ 12 T	1	9	—	—	10
L II	12 W $\times$ 13 S	12	—	—	—	12
L III	85 M_1 $\times$ 13 S	11	7	1	—	19
L IV	85 M_1 $\times$ 12 W	4	7	—	—	11
L V	17 M $\times$ 12 W	17	2	—	—	19
O I	17 M $\times$ 85 M_1	19	4	—	1	24
O II	83 D_2 $\times$ 17 M	34	6	—	1	41
O IX	12 W $\times$ 1 C_1	16	5	—	—	21
T II	12 T $\times$ 13 S	4	1	—	—	5
T III	12 T $\times$ 85 M_1	2	2	—	—	4
T IV	12 T $\times$ 20 X	3	1	—	—	4
T V	12 T $\times$ 83 D_2	5	—	—	—	5
T VI	12 T $\times$ 99 H	2	—	—	—	2
T VIII	12 W $\times$ 83 D_2	3	1	—	—	4
T IX	99 H $\times$ 12 W	6	1	—	—	7
T X	17 M $\times$ 13 S	2	—	—	—	2
T XI	17 M $\times$ 20 X	9	—	—	—	9
T XII	17 M $\times$ 99 H	8	2	—	—	10
T XIII	13 S $\times$ 20 X	3	—	—	—	3
T XIV	13 S $\times$ 83 D_2	5	2	—	—	7
T XV	13 S $\times$ 99 H	6	1	—	—	7
T IXX	83 D_2 $\times$ 99 H	2	—	—	—	2
T XXI	20 X $\times$ 99 H	2	—	—	—	2
	Summe	205	94	4	2	305

Auffallend ist die überwiegende Menge der Bivalentpflanzen. Theoretisch dürften diese nur — gleiche elterliche Translokationen vorausgesetzt — in einem Prozentsatz von 50% auftreten und nur in 25% der Nachkommen, wenn die elterlichen Translokationen verschieden sind. Noch größer ist das Defizit an höher verketteten Formen, den Pflanzen mit zwei 4-Ringen oder einem 6-Ring. Sie müßten bei verschiedenen Translokationen der Kreuzungspartner in 25% der Kreuzungsnachkommen enthalten sein.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß in allen Kreuzungen, in denen keine höheren Konfigurationen als 4-Ringe auftreten, die Translokationen der Eltern gleiche Chromosomen betreffen. Dies ist im Gegenteil der unwahrscheinlichste Fall

Für das Defizit an T.H. lassen sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten finden:

1. Die Gameten mit dem translozierten Genom können den normalen unterlegen sein, so daß überhaupt viel weniger T.H. entstehen, als nach dem Spaltungsschema anzunehmen wäre. Diese Möglichkeit ist nach den cytologischen Befunden nicht auszuschließen. Wahrscheinlicher aber ist eine andere:

2. Die Ringe zerfallen frühzeitig: Die in Tabelle 4 als T.H. aufgeführten Pflanzen enthalten, genau wie ihre Elternpflanzen, nicht in jeder Zelle die an-



Abb. 3. Diakinese mit einer 3-Kette und einem Univalent, 3100 ×

gegebene Konfiguration, und in vielen Fällen war es reiner Zufall, daß sie überhaupt unter der Menge der PMZ mit Uni- und Bivalenten gefunden wurde. Besonders die 6-Ringe und zwei 4-Ringe treten nur in einem ganz geringen Prozentsatz unter den PMZ einer Anthere auf. Die 6-Ringe wurden jeweils nur in ein oder zwei Zellen eines Präparates gefunden, und es kann deshalb noch nicht einmal mit voller Sicherheit gesagt werden, ob die beobachteten Verkettungen von 6 Chromosomen auch wirklich auf Translokationen zurückzuführen sind

Tabelle 5. Häufigkeit der einzelnen Konfigurationen in einer Pflanze mit zwei 4-Ringen

	2 4-Ringe	2 4-Ketten	1 4-Ring	1 4-Kette	1 3-Kette	Bivalent Univalent	Summe
Anzahl der Zellen . . .	1	1	18	15	24	57	116
in Prozent . . .	0,85	0,85	15,6	13,0	20,7	49,0	100

und nicht nur zufälligen Aneinanderlagerungen entstammen. Entsprechende Verhältnisse liegen bei den Pflanzen mit zwei 4-Ringen vor (Tabelle 5). Bei der Auszählung einer Ringpflanze, CI 22, kamen auf 22 PMZ mit 7 Bivalenten 20 mit einem 4-Ring. Aus dieser Angabe und aus Tabelle 5 wird deutlich, daß der

Zerfall der höheren Verkettungen stärker ist als der der niedrigen. Es erscheint deshalb die Annahme berechtigt, daß in einigen Kreuzungen wohl Pflanzen mit einem potentiellen 6-Ring oder mit zwei 4-Ringen vorhanden sind, diese Konfigurationen in der Diakinese aber nicht auftreten. Außerdem ließ sich feststellen, daß der Zerfall der Ringe bzw. Ketten von der frühen Diakinese zur Metaphase hin noch fortschreitet. So waren z. B. in der Pflanze LIII 5, bei der in der frühen Diakinese in mehreren Zellen ein 4-Ring oder eine 3-Kette beobachtet werden konnten, in allen Metaphase-Zellen nur mehr geschlossene oder stabförmige Bivalente und Univalente zu sehen. Wir können annehmen, daß im Pachytän wohl 4-Ringe angelegt werden, aber im Verlauf der Prophase durch einen weitgehenden Chiasma-Ausfall Bivalente zustande kommen.

Es wurde versucht, noch höhere Verkettungen aufzubauen. Zu diesem Zweck wurden Pflanzen, die jeweils einen 6-Ring besaßen, untereinander und mit Pflanzen, die zwei 4-Ringe aufwiesen, gekreuzt. Wegen der Selbststerilität mußten Knospenbestäubungen durchgeführt werden. Es gelang aber nicht, Samenansätze zu bekommen. Die Pflanzen waren zudem zu 70 % pollenletal.

Neben den Kreuzungen wurden auch *Selbstungen* von T.H. durchgeführt. In Tabelle 6 sind die cytologischen Ergebnisse zweier Selbstungen dargestellt.

Tabelle 6. *Aufspaltung bei Selbstung von T.H. in bezug auf die Konfiguration*

Prot.-Nr.	Selbstung	7 Bivalente	4-Ring	Summe
M III	$85M_1 \times 85M_1$	14	10	24
N I	$12W \times 12W$	7	1	8

Das Ergebnis erklärt das in vielen Fällen geringe Auftreten von T.H. in den Kreuzungen mit 12W und umgekehrt die relativ vielen T.H. in $85M_1$ -Kreuzungen (siehe Tabelle 4).

Das Verhältnis der Samenansätze der Selbstungen zu denen der Kreuzungen bringt ebenfalls einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit der oben angeführten Gründe für das Defizit an translozierten Pflanzen in T.H.-Kreuzungen (Tabelle 7).

In 5 von 8 Fällen zeigen die Selbstungen einen besseren Ansatz als die Kreuzungen. Man muß deshalb annehmen, daß die Translokationshomozygoten

Tabelle 7. *Durchschnittliche Samenzahl pro Kapsel bei Selbstungen und Kreuzungen*

	Selbstung Durchschnitt	Kreuzung mit anderen T.H.		Anzahl Bestäubungen
		Durchschnitt	Prozent der Selbstung	
1 C ₁	72,0	90,3	79,5	10
12 W	73,3	60,1	121,8	32
12 T	122,9	162,3	75,8	23
85 M ₁	76,7	85,6	89,5	47
17 M	89,7	131,5	68,2	17
13 S	70,1	71,5	98,0	21
83 D ₂	93,5	66,8	139,9	19
20 X	98,8	75,5	130,8	10

lebensfähig sind. Das Defizit im Ansatz der Kreuzungen wird auf Kosten derjenigen Pflanzen gehen, die beide elterlichen Translokationen besitzen und daher am meisten gestört sind.

Diese Pflanzen müßten 25 % der Kreuzungsnachkommen ausmachen. In den meisten Fällen steht aber der Samenansatz der Kreuzungen dem der Selbstungen um weniger als

25% nach. Das völlige Fehlen von Pflanzen mit mehr als 1 Translokation ist dadurch also nicht zu erklären. Es ist möglich, daß ihre Zahl durch Letalität geringer wird, als es der Spaltungsregel entspricht. Wenn man annähme, daß ihre Zahl um ungefähr die Hälfte vermindert wäre, dann müßte immerhin bei z. B. 22 untersuchten Pflanzen noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% eine Pflanze mit höherer Verkettung gefunden werden. Es wird also auch hier deutlich, daß das Fehlen der höher verketteten Formen keine rein genetischen Gründe haben kann, sondern auf cytologischen Besonderheiten beruhen muß.

Wie läßt sich dieser ungewöhnliche Ausfall an Ringen in unseren Translokationsheterozygoten verstehen? Eine genaue Aufklärung könnte die Beobachtung des Pachytäns geben. Dieses Stadium ist bei *Petunia* nicht analysierbar, und man ist auf die wenigen Fälle angewiesen, in denen zufällig ein Chromosomenende aus dem Knäuel der

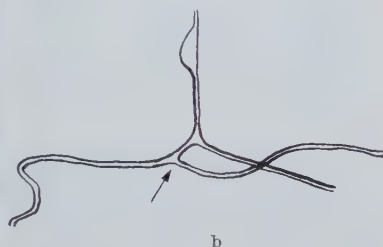


Abb. 4a u. b. a Pachytän mit Kreuzfigur (s. Pfeil), 3600 $\times$. b Schematische Einzeldarstellung der Kreuzfigur

Pachytänfäden herausragt. In einem Fall konnte deutlich ein Teil der Kreuzfigur erkannt werden (Abb. 4).

In einem zweiten Fall ragte das Ende eines Paarlings aus den verknäuelten Fäden heraus. Der Mittelteil erschien eng gepaart, während die Enden sich auseinanderspreizten. Hier lag die Vermutung nahe, daß diese kurzen Enden inhomolog sind. Wegen seiner Kürze hat sich das translozierte Ende b' nicht mit dem ihm homologen Stück des untranslozierten Chromosoms b paaren können (Abb. 5).

Man könnte nach diesem Befund das seltene Auftreten von 4-Ringen durch die Kleinheit der translozierten Abschnitte erklären. Dies mag gewiß für einige Fälle zutreffen, aber es ist unwahrscheinlich, daß bei allen 11 Translokationen die ausgetauschten Stücke eine so geringe Größe haben sollen. Im allgemeinen wird wohl der in der Diakinese sichtbare und zur Metaphase hin noch fortschreitende Bindungsausfall für die seltene Manifestation der Ringe verantwortlich zu machen sein.

Fassen wir das cytologische Verhalten der reziproken Translokationen zusammen, dann ergibt sich folgendes Bild:

Durch Pollenbestrahlung läßt sich eine beträchtliche Anzahl reziproker Translokationen erzeugen. Sie manifestieren sich jedoch in den Heterozygoten nicht in der zu erwartenden Weise als regelmäßige 4-Ringe in der Diakinese, sondern in dem größten Teil der PMZ fehlt diese charakteristische Konfiguration.

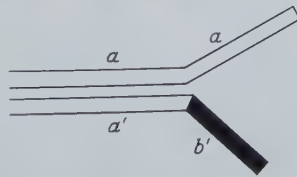


Abb. 5. Ungepaarte, inhomologe Enden eines Bivalentes, Schema

Der Aufbau höherer Verkettungen durch Kreuzung zweier verschiedener T.H. ist zwar möglich, aber der Erfolg ist nur in wenigen Fällen festzustellen, weil mit steigendem Verkettungsgrad die Tendenz zur Auflösung der Ringe zunimmt. Diese Erscheinung wird auf einen hohen Bindungsausfall und die geringe Größe der translozierten Segmente zurückgeführt.

b) Die Pollenletalität der Translokationsheterozygoten. Da die Pollenletalität für die weiteren Überlegungen wichtig ist, wurde zuerst geprüft, ob die ein-

Tabelle 8. Auszählung der Pollenletalität einiger T.H. und einer normalen Pflanze zu verschiedenen Zeiten

Prot.-Nr.	Sommer 1953 %	Herbst 1953 %	Herbst 1954 %
85 M ₁	—	59,0	66,2
20 X	—	73,2	66,9
12 T	52,6	54,5	58,3
17 M	51,8	47,4	49,3
12 W	51,7	51,9	51,3
1 C ₁	55,1	57,7	55,8
84 X ₂	—	78,4	76,9
T ₂ AE	12,4	16,7	—

maligen Pollenauszahlungen an T.H. für die einzelnen Pflanzen charakteristisch sind, oder ob die Letalität in gewissen Ausmaßen von Außen-

einflüssen abhängig ist. Es wurden darum bei einigen T.H. in längeren Zeitabständen die Pollenauszahlungen wiederholt (Tabelle 8). Im allgemeinen stimmen die einzelnen Daten gut miteinander

überein. Die Schwankungen bei 85 M₁, 20 X und T₂ AE sind zwar ziemlich stark und gewiß nicht mehr zufällig bedingt, aber doch nicht so bedeutend, als daß sie ein völlig falsches Bild hervorrufen könnten. Sie zeigen jedoch, daß eine Ab-

weichung um einige Prozent von einem erwarteten Wert nicht unbedingt auf cytologische oder genetische Veränderung zurückgeführt zu werden braucht.

Bei frisch erzeugten Translokationsheterozygoten kann man annehmen, daß sie sich durch eine regelmäßige Semi-

Tabelle 9. Pollenletalität der T.H.

Prot.-Nr.	Letalität %	Prot.-Nr.	Letalität %
1 C ₁	55,4	19 I	50
7 R	50	20 X	73,2
12 T	54,5	83 D	55,3
12 W	51,9	85 M ₁	59,0
13 S	49,4	99 H	60
17 M	49,3		

sterilität auszeichnen. Es wurden darum nur solche Pflanzen cytologisch auf Translokationen untersucht, die eine Pollenletalität von 50% und höher aufwiesen. Die unter ihnen gefundenen T.H. entsprachen dann auch dieser Erwartung (Tabelle 9). Für die außergewöhnlich hohe Sterilität von 20 X konnte keine cytologische Ursache gefunden werden. Es ist möglich, daß kleine Deletionen oder Inversionen neben der Translokation stattgefunden haben.

Neben diesen 11 Translokationsheterozygoten und 20 anderen Pflanzen, die deutlich Abnormalitäten in Diakinese, Metaphase I oder Anaphase I, II zeigten, wurden noch weitere 130 semisterile Pflanzen untersucht, in deren meiotischen Teilungen aber nicht die geringste Störung festgestellt werden konnte. Demnach ist bei *Petunia* die Pollenletalität kein absoluter Hinweis auf chromosomale Mutationen. Das beweist u. a. auch die teilweise sehr hohe Pollenletalität der Selbstungsnachkommen von T₂U und T₂AE (s. Abb. 1), denn diese Pflanzen sind cytologisch normal.

Es erhebt sich nun die Frage, ob sich eine vorhandene Translokation immer durch eine hohe Pollenletalität äußert. Hierüber geben die Ergebnisse der Selbstungen und Kreuzungen von T.H. Aufschluß. In diesen Nachkommenchaften wurden Stichproben unter den 20—40% sterilen Pflanzen gemacht, und es fanden sich auch unter diesen relativ fertilen Exemplaren Translokationsheterozygoten. Die niedrigste Sterilität, bei der noch ein 4-Ring gefunden wurde, betrug 24%. Ein 6-Ring trat in einer 40% sterilen Pflanze auf. Somit können wir sagen, daß einerseits die Pollenletalität kein Hinweis auf das Vorhandensein einer reziproken Translokation ist (wegen des Auftretens steriler, ringfreier Formen!), und daß andererseits eine vorhandene reziproke Translokation sich nicht durch eine charakteristische Pollenletalität, bei einer 4-Ring-Form also durch Semisterilität, auszuzeichnen braucht.

Schwieriger als die hohe Sterilität normaler Pflanzen, die auf mikroskopisch nicht erkennbare kleine Deletionen oder Duplikationen zurückgeführt werden muß, ist die hohe Fertilität von T.H. zu erklären. Hat eine Pflanze in allen ihren PMZ einen 4-Ring, dann sind bei regelmäßiger wechselseitiger Verteilung alle Gameten fertil, bei einer zufallsgemäßen Verteilung tritt Semisterilität auf. An einer sehr konstant realisierten Verkettung (s. Tabelle 10) konnten wir eine

Tabelle 10. Anordnung der Kettenchromosomen von 12T in Metaphase I

	Wechselseitig 	Nicht-wechselseitig 	Univalent 
Anzahl der Zellen in Prozent	100 69,5	37 25,7	7 4,8

Bevorzugung des alternierenden Typus feststellen. Darum müßten wir bei *Petunia* also — regelmäßige Ringbildung vorausgesetzt — nahezu völlig fertile T.H. antreffen. Diese Voraussetzung trifft aber nicht zu. Ein großer Teil der Ringe ist in Bi- und Univalente zerfallen. Diese verteilen sich in der Anaphase unabhängig voneinander, rein zufallsgemäß. Im Extrem würde also eine Pflanze, deren Ringe zu 100% zerfallen sind, semisteril sein: je höher der Bindungsausfall, desto größer die Sterilität. Umgekehrt dürfen wir auch sagen: je höher die Fertilität, desto schwächer der Bindungsausfall. Es ist nicht möglich, für einzelne Pflanzen genauere Berechnungen durchzuführen, da bei *Petunia* auch normale, bivalentbildende Pflanzen mehr oder minder pollenletal sein können und außerdem auch nur eine bevorzugte, nicht aber ausschließliche wechselseitige Verteilung festgestellt wurde.

c) Eine monosome Translokationsheterozygote. Aus den vorangehenden Kapiteln wird deutlich, daß bei *Petunia* die cytogenetischen Methoden zur Lokalisation von Genen mittels T.H. nicht anwendbar sind. Sie basieren nämlich auf der absoluten Zuordnung der Semisterilität zu einer T.H. Darum hätten wir darauf verzichten müssen, das Selbststerilitätsgen mit bestimmten translozierten Chromosomen in Zusammenhang zu bringen, wenn nicht der Zufall uns eine Pflanze in die Hand gegeben hätte, die uns diese Aufgabe doch möglich machte. Es handelt sich um 12T, eine im Sommer 1953 aufgefundene Translokationsheterozygote. Diese Pflanze war monosom, und zwar fehlte ihr ein Chromosom

des 4-Ringes. In der Metaphase I fanden sich ziemlich regelmäßig eine 3-Kette und 5 Bivalente (Abb. 6). Die beiden Platten der Metaphase II enthielten 7 und 6 Chromosomen, gelegentlich auch 8 und 5. Diese zahlenmäßig falsche Verteilung ist auf ein Zusammenbleiben gepaarter Chromosomen in Ana. I zurückzuführen. Meist ordnen sich die Chromosomen in Metaphase I in wechselseitiger Stellung an (Tabelle 10).

Im Vergleich zu anderen T.H. ist der Chiasmenausfall in der Kette sehr niedrig. Die Pollenletalität beträgt 58,3%.

Wir untersuchten die Mitose von 12T, um eventuell feststellen zu können, welches Chromosom verlorengegangen war. Präparate, die nach der Nucleal-Methode hergestellt wurden, zeigten, daß beide Satellitenchromosomen noch



Abb. 6a u. b. a Metaphase I von 12T 5 Bivalente und 1 3-Kette, 2000 $\times$. b Schematische Darstellung der Metaphasenpaarung

vorhanden sind. Sie scheinen jedoch ungleich lang: Eines von ihnen ist regelmäßig sehr viel größer als alle anderen Chromosomen des Genoms (Abb. 7).

Nach MARTHALER (1936) hat das SAT-Chromosom ungleich lange Schenkel. Bezeichnen wir das SAT-Chromosom mit 1—2 und ein zweites Chromosom mit 3—4, dann darf man annehmen, daß das neue SAT-Chromosom von 12T auf folgende Weise bei der Bestrahlung entstanden ist (Abb. 8).



Abb. 7. Mitose von 12T, etwa 3000 $\times$

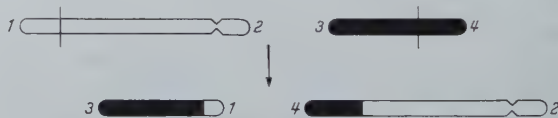


Abb. 8. Schematische Darstellung der reziproken Translokation in 12T

Das ebenfalls durch die Translokation entstandene kleine Chromosom 1—3 muß im Laufe der Entwicklung von 12T verlorengegangen sein.

Die cytologischen Besonderheiten wirken sich auch auf das genetische Verhalten der Pflanze aus: Bei der Prüfung der Aufspaltung der S-Gene stellte sich heraus, daß alle 35 Pflanzen der Selbstungsnachkommenschaft homozygot S_3S_3 waren. Da die Großeltern homozygot S_2 bzw. S_3 waren, hätte man in der F_2 S_2S_2 , S_3S_3 - und S_2S_3 -Pflanzen erwarten müssen. Darum wurden alle Kreuzungen, in denen 12T als Elter gedient hatte, auf ihre S-Gene hin getestet. Das Ergebnis stimmt mit dem der Selbstungen überein. Die Kreuzungen $S_2S_3 \times 12T$ spalten

Tabelle 11. *Spaltung der S-Gene in Kreuzungen mit 12 T*

Prot.-Nr.	Kreuzung $S_2S_3 \times 12 T$	S_2S_3	S_3S_3	S_2S_1	χ^2 Rückkreuzung	P
CL II	$1 C_1 \times 12 T$	49	26	—	5,565	<0,01
E IV	$12 T \times 1 C_1$	25	4	—	15,2	<0,01
II	$12 W \times 12 T$	32	18	—	3,90	0,05

wie eine Rückkreuzung $S_2S_3 \times S_3S_3$ auf, d. h. in den Nachkommenschaften findet man nie S_2 -Homozygote (Tabelle 11).

Das überwiegende Auftreten der S_2S_3 -Pflanzen — sie sollten genauso häufig wie S_3S_3 sein — zeigt an, daß die S_3S_3 -Homozygoten schlecht lebensfähig sind. Daß aber der völlige Ausfall der S_2S_2 -Pflanzen nicht auf das gleiche, bloß um vieles verstärkte Phänomen zurückzuführen ist, beweist das Auftreten von S_2S_2 -Pflanzen in erwartungsgemäßer Anzahl in anderen Kreuzungen, die nicht 12T enthalten, wohl aber einen ebenso starken S_3 -Homozygotenausfall aufweisen.

12T müßte vom Vater T_2AE (mit 10000 r bestrahlt) das Allel S_2 erhalten haben. Eine Mutation im T_2AE -Pollen von S_2 nach S_1 kann nicht stattgefunden haben, denn 12T und ihre Nachkommen sind selbststeril. Die Annahme, daß S_2 in 12T so eng mit einem Letalfaktor gekoppelt ist, daß es in der Nachkommenschaft gar nicht mehr auftritt, entfällt gleichfalls, weil S_2 -Pollen auf 12T-Griffeln ungehemmt durchwächst.

Aus diesen Überlegungen und Befunden geht hervor, daß 12T nur ein S-Gen besitzen kann, nämlich S_3 , und daß das väterliche Allel verlorengegangen sein muß.

Wir haben festgestellt, daß der Pflanze 12T sowohl ein Gen als auch ein Chromosom fehlt. Es erhebt sich die Frage, ob der Verlust des Chromosoms mit dem des Gens in ursächlichem Zusammenhang steht. Wir versuchen im folgenden den Beweis zu führen, daß das Gen S_2 auf dem fehlenden Chromosom liegt. In diesem angenommenen Fall müssen alle Pflanzen der Kreuzung $12T \times T_2AE$ (S_2S_2), die nur S_2 enthalten, eine 3-Kette aufweisen. Findet man aber auch unter den S_2S_3 -Pflanzen solche mit einer Kette, dann ist das ein Zeichen, daß das S-Gen nicht auf einem Chromosom der 3-Kette liegt, und wir müssen annehmen, daß eines der restlichen, untranslozierten Chromosomen eine Schädigung erlitten hat. Außerdem gibt es noch die Möglichkeit, daß gar keine reinen S_2 -Pflanzen auftreten, weil die (n-1)-Gameten nicht lebensfähig sind. Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu prüfen, wurde 12T mit T_2AE gekreuzt (Abb. 9).

Von der Nachkommenschaft wurden 25 Pflanzen cytologisch analysiert. Davon waren 9 mehr als 40% pollenletal. Alle besaßen das vollständige Genom von 14 Chromosomen. In keinem Fall konnte eine 3-Kette oder ein 4-Ring gefunden werden.

Alle diese Pflanzen wurden außerdem auf ihren Bestand an S-Genen geprüft. Durch den Elter T_2AE gelangte regelmäßig das S_2 -Allel in die Nachkommen. Aber auch S_3 ließ sich bei allen untersuchten Pflanzen nachweisen. Die ganze Nachkommenschaft ist also heterozygot S_2S_3 . Das ist der Beweis dafür, daß keine lebensfähigen (n-1)-Gameten gebildet werden, weder im weiblichen noch im männlichen Geschlecht. Deshalb wird weder die Monosomie noch die reziproke Translokation vererbt. Daher ist ein direkter Beweis, daß das S-Gen auf dem verlorengegangenen translozierten Chromosom liegt, unmöglich.

Trotzdem beweist der Ausgang dieses Versuches indirekt die Richtigkeit unserer Hypothese, nach der das S-Gen auf einem der Chromosomen liegt, die an der Kettenbildung beteiligt sind: Man konnte feststellen, daß keine Gameten gebildet werden, die normal haploid sind, denen aber das S-Gen fehlt. Dieses müßte aber unbedingt der Fall sein, wenn der S-Locus auf einem der bivalent-

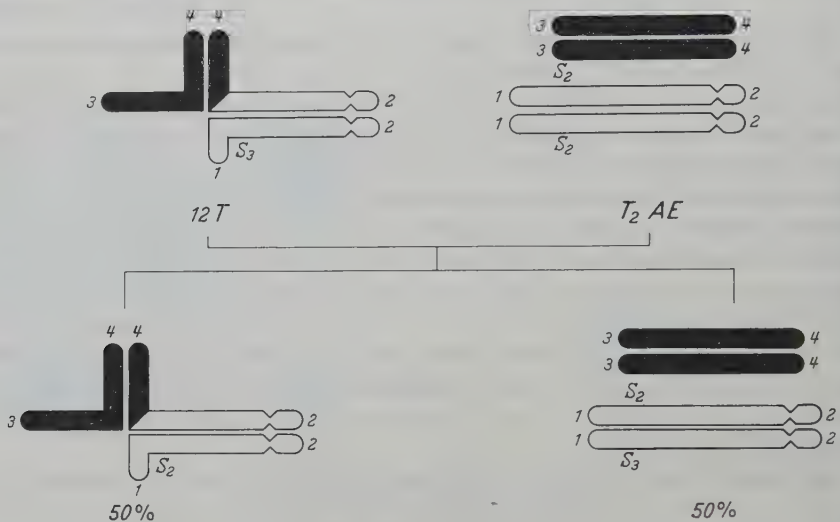


Abb. 9. Schema der Kreuzung $12T \times T_2AE$

bildenden Chromosomen läge und dort infolge Deletion ausgefallen wäre. Die Pollenletalität von 58,3% wird allein durch die Monosomie erklärt und läßt keinen Platz mehr für eine zusätzliche Gametenletalität durch Deletion. Träfe unsere obige Hypothese nicht zu, dann hätten wir reine S_2 -Pflanzen finden

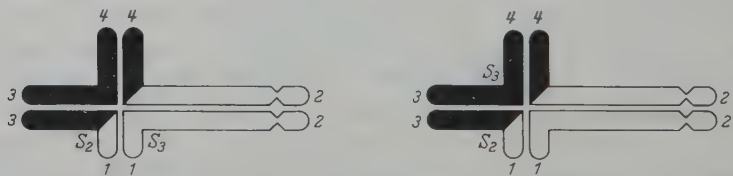


Abb. 10. Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten für die Lage der S-Gene auf den Schenkeln der Chromosomen 1—2, 1—3, bzw. 1—3, 3—4

müssen. Da aber nur S_2S_3 -Pflanzen auftreten, muß das S_2 -Gen in 12T auf einem der translozierten Chromosomen liegen. Es ließ sich wahrscheinlichmachen (s. oben), daß das SAT-Chromosom an der Translokation beteiligt ist. Ob das Gen auf diesem (1—2) oder dem anderen uns unbekannten Chromosom (3—4) liegt, können wir leider nicht entscheiden. Fügen wir das in der Monosomen fehlende Chromosom für den 4-Ring hinzu, dann bestehen für die Lage des S-Genes folgende 2 Möglichkeiten (Abb. 10).

Es blieb nun noch zu prüfen, ob die Vererbung des Pollenfarbgenes W in 12T sich normal vollzieht. 12T ist heterozygot Ww. Das Allel w stammt aus dem mütterlichen Erbgut:

$$\begin{array}{lcl} P & T_2U (Ww) \times T_2AE (WW) & \text{bestrahlt} \\ F_1 & & 12T (Ww) \end{array}$$

In der Selbstungsnachkommenschaft von 12T spaltet das Gen normal auf: 26 weiß; 8 gelb. Diese ungestörte Spaltung zeigt, daß der Locus von W nicht auf einem der in 12T translozierten Chromosomen liegen kann. Das bedeutet, daß er nicht mit dem S-Locus gekoppelt ist. Dieses Ergebnis bestätigt den Koppelungstest für die beiden Gene in der Kontrollkreuzung.

Besprechung der Ergebnisse

Im experimentellen Teil der Arbeit konnten wir zeigen, daß sich die 4-Ringe von *Petunia* sehr charakteristisch verhalten: In Pflanzen, die in der Diakinese Ringfiguren aufweisen, findet man in der späten Metaphase nur noch Bivalente und Univalente. Aber auch schon bei den Diakinesen von T.H. ist der Prozentsatz der PMZ mit einer Vierer-Konfiguration gering. Dieser Zerfall der Ringe wird mit fortschreitender Zahl der reziproken Translokationen stärker, so daß die aus den T.H.-Kreuzungen zu erwartenden Pflanzen mit zwei 4-Ringen oder einem 6-Ring nur in wenigen Fällen zu identifizieren sind. In der Literatur über reziproke Translokationen werden mehrere Fälle dieser Art berichtet. So beschreibt HAKANSSON (1934) eine *Pisum*-Pflanze, die außer PMZ mit einem 6-Ring auch solche mit lauter Bivalenten enthielt. SUTTON (1935) fand, daß von 161 PMZ einer *Pisum*-Translokationsheterozygote 22 nur Bivalente besaßen. Der Prozentsatz der Zellen mit voller Konfiguration ist also bedeutend höher als bei *Petunia*, wo z. B. auf 22 Zellen mit Bivalenten 20 mit 4-Ringen kommen. Entsprechende Verhältnisse wie bei *Pisum* kann man auch beim *Mais* finden (ANDERSON 1935). Bei *Rhoeo* (COLEMAN 1941) geht der Zerfall des 12-Ringes nicht bis zu den Bivalenten herab, wohl aber kommt es in 20% der PMZ zum Auftreten von 2 Ketten. Auch bei *Tradescantia* gibt es Translokationsheterozygoten, die in 15% ihrer PMZ nur Bivalente enthalten (SAX und ANDERSON 1933). Das gleiche berichten BURNHAM, WHITE und LIVERS (1954) von der *Gerste*, WANNER (1941) von *Primula* und GAIRDNER und DARLINGTON (1931) von *Campanula*. Auch bei *Oenotheren*-Translokationen treten Brüche in den Ringen auf (OEHLKERS 1935), die mit steigender Verkettung zunehmen (HOFFMANN 1954). In allen genannten Fällen ist aber dieses Phänomen kein allgemein gültiges Charakteristikum der betreffenden Art oder Gattung. Daneben gibt es bei ihnen Sippen oder Arten, welche sich gerade durch hohe Stabilität der cytologischen Konfigurationen auszeichnen. Das Musterbeispiel dafür ist *Oenothera*. Bei *Petunia* dagegen fanden wir 11 T.H. der X_1 und 94 der X_2 , die nur 4-Ringe mit hohem Bindungsausfall besaßen. Ein Zerfall der Ringe in sämtlichen untersuchten Individuen wird nur von *Physalis alkekengi* — einer *Solanacee* wie *Petunia* — beschrieben (GOTTSCHALK 1954a). GOTTSCHALK nimmt als Grundfigur einen 10-Ring an, der in geschlossener Form aber niemals verwirklicht ist. Man findet alle möglichen Grade der Verkettung, bis zu Bi- und Univalenten herab. Der Bindungsausfall bei *Petunia* findet also Parallelen bei anderen T.H.

Für diesen Bindungsausfall lassen sich zwei Erklärungsmöglichkeiten angeben. Im Pachytän erfolgt überhaupt keine Paarung der translozierten Chromosomenstücke, oder es werden keine oder zu wenig Chiasmen in den gepaarten Viererverbänden gebildet.

Den ersten Fall berichten COLEMAN (1941) von *Rhoeo* und CLARKE und ANDERSON (1935) von gewissen *Mais*-Translokationen. Der Grund für den Paarungsausfall liegt in der geringen Größe der translozierten Segmente. Statt

eines 4-Ringes werden in der Meiose 2 Bivalente gebildet, von denen jedes ein Ende mit auseinandergespreizten Partnern besitzt. Ist eines der translozierten Stücke größer, vollzieht sich die Paarung zu einer offenen Vierer-Figur; diese geht bis zur Diakinese in eine 4-Kette über (Abb. 11).

Daß beide geschilderten Möglichkeiten bei den *Petunien*-Translokationen gelegentlich verwirklicht sind, konnten wir im Pachytän direkt beobachten. Daneben aber finden wir Pachytänbilder mit einer vollkommen gepaarten Kreuzfigur. In manchen Fällen mag die Länge der ausgetauschten Segmente noch zur Paarung reichen, nicht aber mehr zur Chiasmenbildung, denn die Zahl der gebildeten Chiasmen ist abhängig von der Größe der Chromosomenschenkel. Dafür gibt es Beispiele. Bei *Rhoeo* treten die Brüche vorzüglich an den Stellen des 12-Ringes auf, an denen zwei kurze Chromosomenschenkel aneinanderstoßen

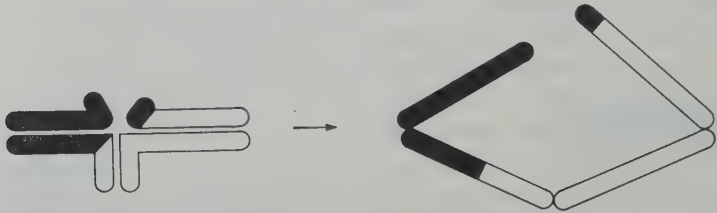


Abb. 11. Schematische Darstellung des Überganges einer offenen 4-Figur des Pachytäns zu einer 4-Kette in der Diakinese

(SAX 1935). Wir vermuten, daß solche Paarungsverhältnisse auch an den Brüchen der 4-Ringe von *Petunia* schuld sind.

Schließlich dürfte eine offenbar ganz allgemeingültige Eigenschaft der Endchiasmen von Translokationsfiguren für den Zerfall der *Petunien*-Ringe maßgebend sein: Die Ringe von T.H. sind nach mehreren Untersuchungen bevorzugte Orte des Chiasmenausfalls. Dies konnte BURNHAM (1934) auf rein genetischem Wege nachweisen, indem er zeigte, daß das crossing-over zwischen Genen, die auf einem translozierten Chromosom liegen, reduziert ist. Cytologisch konnte es durch Zählen der ausgefallenen Bindungen festgestellt werden (MARQUARDT 1948, HARTE 1954a und b, HOFFMANN 1954). Nach HARTE trifft der Bindungsausfall am leichtesten die Chromosomenendbindungen, die sich im Ring gegenüberliegen. Diese Tatsache könnte für das Überwiegen der stabförmigen Bivalente gegenüber den Univalenten verantwortlich zu machen sein.

Die in den T.H. von *Petunia* festgestellten meiotischen Verhältnisse stehen mit den Translokationen selbst in Zusammenhang. Wir müssen aber annehmen, daß der Paarungsausfall auch durch Störung des genetischen Gleichgewichtes, eine Folge der Röntgenbestrahlung und der anschließenden Kreuzung, bedingt werden kann. In 2 X_2 -Pflanzen, die keinen 4-Ring aufwiesen, waren die Bivalente von einem starken Bindungsausfall betroffen (im Mittel 8,6 Endbindungen an Stelle von 14).

Für den Grad der Chiasmenbildung ist auch der Gehalt der Chromosomen an Heterochromatin maßgebend. Es ist bekannt, daß in heterochromatischem Material fast keine Chiasmen gebildet werden. Von der Gesamtlänge des Chromosoms sind also die heterochromatischen Teile abzuziehen, wenn man die Längen der Chromosomen erhalten will, die wirklich zur Chiasmenbildung fähig sind.

Unter den von GOTTSCHALK (1954b) untersuchten *Solanaceen* hat die Gattung *Petunia* den höchsten Heterochromasiegrad. Wir können also den Gründen für den starken Bindungsausfall bei den *Petunien*-Translokationen noch die Chiasmenreduktion durch einen hohen Heterochromatingehalt hinzufügen.

Einleitend zu dieser Arbeit haben wir *Zea Mays* und *Oenothera* in bezug auf das cytologische Verhalten als zwei extrem verschiedene Formen einander gegenübergestellt. Die *Oenotheren*-Ringe zeigen regelmäßige Zickzack-Verteilung, eine gute Terminalisation der Chiasmen und hohe Gameten-Fertilität. Die stets vorhandene Semisterilität der *Mais*-Translokationen wird der zufallsgemäßen Verteilung der Ringchromosomen zugeschrieben; alle möglichen Bindungen werden beim *Mais* realisiert, und die Terminalisation der Chiasmen ist äußerst gering. Das gleiche gilt für *Pisum* (DARLINGTON 1936). Zwischen beiden Extremen steht *Campanula persicifolia* (DARLINGTON und GAIRDNER 1937). Ihre natürlich auftretenden T.H. sind stärker steril als die von *Oenothera*, aber nicht semisteril wie die T.H. vom *Mais*. Da *Campanula p.* auch vollständig terminalisierende Chiasmen besitzt und die Bindungsverhältnisse gut sind, sollte man erwarten, daß sich *Oenothera* und *Campanula* nicht unterscheiden in bezug auf die Fertilität. Die Tatsache, daß *Campanula* höhere Gametenletalität besitzt als *Oenothera*, muß auf die gelegentlich unregelmäßige Verteilung der 4-Ringe (3:1 statt 2:2) zurückgeführt werden. *Petunia* steht cytologisch *Oenothera* und *Campanula* nahe. Sie könnte auf Grund ihrer guten Terminalisation konstante, hochfertile Ringformen aufbauen. Dies wird aber durch den hohen Bindungsausfall unmöglich gemacht. So erreicht die Pollenletalität bei *Petunia* durch einen Mangel an Endbindungen den gleichen Grad wie bei *Zea Mays* und *Pisum*, welche ihre Semisterilität unvollständiger Terminalisation verdanken.

Zusammenfassung

1. Cytologie und Genetik mehrerer durch Röntgenstrahlen ausgelöster Translokationsheterozygoten einer selbststerilen Sippe von *Petunia hybrida hort.* wurden untersucht.
2. Die 4-Ringe in den Translokationsheterozygoten manifestieren sich nur in einem Teil der PMZ. Die restlichen Zellen bilden in der Diakinese und Metaphase nur Bivalente und Univalente. Mit steigendem Verkettungsgrad nimmt die Tendenz zur Auflösung der Ringe zu.
3. Die Ursache dieser Erscheinung ist in einem außergewöhnlich hohen Chiasmenausfall zu suchen. Dieser hat in einigen Fällen seinen Grund in der Kürze der ausgetauschten Segmente, stets jedoch in der starken Heterochromasie und in der Empfindlichkeit der Chiasmenbildung gegenüber Störungen innerhalb des Genoms.
4. Die Ringchromosomen verteilen sich in Anaphase I vorzüglich wechselseitig.
5. Reziproke Translokationsformen von *Petunia* besitzen keinen charakteristischen Pollenletalitätsgrad.
6. Es wird eine monosome Translokationsheterozygote beschrieben. Ihr fehlen ein Chromosom des ursprünglichen 4-Ringes und das S_2 -Gen. Es konnte nachgewiesen werden, daß das Gen auf dem fehlenden Chromosom lokalisiert ist. Wahrscheinlich ist das SAT-Chromosom an der Translokation beteiligt. Als

Träger des S-Locus kommt entweder das SAT-Chromosom oder ein anderes morphologisch noch nicht identifiziertes Chromosom in Frage, das mit dem SAT-Chromosom eine reziproke Translokation eingegangen ist.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. STRAUB, danke ich für die Stellung des Themas, die Überlassung des Pflanzenmaterials und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Summary

1. Experiments were carried out to investigate the cytology and genetics of some X-ray-induced translocation heterozygotes of a selfsterile line of *Petunia hybrida hort.*

2. The rings-of-four in the translocation heterozygotes appear in only a fraction of the pollen mother cells. The other cells form only bivalents and univalents at diakinesis and metaphase. As the size of the rings increases, the tendency to break up also increases.

3. The cause of these observations is an exceptionally great reduction in the frequency of chiasmata. In some cases this reduction has its basis in the shortness of the exchanged segments. However, it is always related to the high amount of heterochromatic regions and to the sensitivity of chiasma formation in regard to disturbances within the genome.

4. In anaphase I the ring chromosomes preferentially segregate in an alternate manner.

5. No characteristic pollen sterility is associated with translocation forms in *Petunia*.

6. A monosomic translocation heterozygote is described. In this plant one chromosome of the original ring-of-four and the S_2 gene are lacking. It could be shown that this gene is localized on the missing chromosome. It is probable that the satellite chromosome is involved in the interchange. The carrier of the S-locus is either the satellite chromosome or another, morphologically unidentified chromosome which is involved in a reciprocal translocation with the satellite chromosome.

Literatur

- ANDERSON, E. G.: Chromosomal interchanges in *Maize*. *Genetics* **20**, 70—83 (1935).
 BURNHAM, C. R.: Chromosomal interchanges in *Maize*: Reduction of crossingover and the association of non-homologous parts. *Amer. Naturalist* **68**, 81—82 (1934). — BURNHAM, C. R., F. H. WHITE and R. LIVERS: Chromosomal interchange in *Barley*. *Cytologia* (Tokyo) **19**, 191—202 (1934). — CLARKE, A. E., and E. G. ANDERSON: A chromosomal interchange in *Maize* without ring-formation. *Amer. J. Bot.* **22**, 711—716 (1935). — COLEMAN, L. C.: Relation of chromocenters to the differential segments in *Rhoeo discolor*. *Amer. J. Bot.* **28**, 742—748 (1941). — DARLINGTON, C. D.: The limitation of crossing-over in *Oenothera*. *J. Genet.* **32**, 343—352 (1936). — DARLINGTON, C. D., and A. E. GAIRDNER: The variation system in *Campanula persicifolia*. *J. Genet.* **35**, 97—138 (1937). — GAIRDNER, A. E., and C. D. DARLINGTON: Ring-formation in diploid and polyploid *Campanula persicifolia*. *Genetics* **13**, 113—150 (1931). — GOTTSCHALK, W.: Das Auftreten kettenförmiger Chromosomenverbände in der Meiosis verschiedener *Physalis*-Arten. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb. Lehre* **86**, 157—172 (1954a). — Die Chromosomenstruktur der Solanaceen. *Chromosoma* (Berl.) **6**, 539—626 (1954b). — HAKANSSON, A.: Chromosomenbindungen in einigen Kreuzungen zwischen halbsterilen *Erbsen*. *Hereditas* (Lund) **19**, 341—358 (1934). — HARTE, C.: Untersuchungen über die Variabilität der Chiasmenbildung bei *Oenothera*-Bastarden. II. Die Verteilung der Endchiasmen auf Ring- und Bivalentenchromosomen in Formen mit einem

Viererring. Chromosoma (Berl.) **6**, 237—276 (1954a). — Die Verteilung der Endchiasmen auf Ring- und Bivalentenchromosomen bei *Oenothera albicans-stringens*. Chromosoma (Berl.) **6**, 301—313 (1954b). — HEITZ, E.: Die Nucleal-Quetschmethode. Ber. dtsch. bot. Ges. **53** (1936). — HOFFMANN, A.: Untersuchungen über interstitielle Chiasmen bei *Oenothera*. Chromosoma (Berl.) **6**, 277—300 (1954). — KOSTOFF, D.: Eine tetraploide *Petunia*. Z. Zellforsch. **10**, 783—786 (1930). — Changes in chiasma frequency in *Petunia*. Curr. Sci. **6**, 555—556 (1938). — KOSTOFF, D., and J. KENDALL: Studies on certain *Petunia* aberrants. J. Genet. **24**, 165—178 (1931). — LEVAN, A.: On chromosome fragments in *Petunia*. Svensk bot. T. **31**, 1—10 (1937a). — Chromosome numbers in *Petunia*. Hereditas (Lund) **23**, 99—112 (1937b). — MARQUARDT, H.: Das Verhalten röntgeninduzierter Viererringe mit großen interstitiellen Segmenten bei *Oenothera Hookeri*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **32**, 415—429 (1948). — MARTHALER, H.: Morphologie der Chromosomen des Zellkernes von *Petunia*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **72**, 258—266 (1936). — MATHER, K.: Specific differences in *Petunia*. J. Genet. **45**, 215 (1944). — The measurement of linkage in heredity. London: Methuen 1951. — OEHLKERS, F.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. I. Z. Bot. **29**, 1—53 (1935). — RICK, CH. M.: Cytogenetic consequences of x-ray treatment of pollen in *Petunia*. Bot. Gaz. **104**, 528—540 (1943). — SAX, K.: Chromosome structure in the meiotic chromosomes of *Rhoeo discolor* Hance. J. Arnold Arboretum **16** (1935). — SAX, K., and E. ANDERSON: Segmental interchange in chromosomes of *Tradescantia*. Genetics **18**, 53—67 (1933). — STRAUB, J.: Zur Entwicklungsphysiologie der Selbststerilität von *Petunia*. Z. Naturforsch. **1**, 287—291 (1946). — SUTTON, E.: Half-disjunction in an association of four chromosomes in *Pisum sativum*. Ann. of Bot. **49**, 689—698 (1935). — TJO, J. H., and A. HAGBERG: Cytological studies on some x-ray mutants of *Barley*. An. Etac. exp. Aula Dei **2**, 149—167 (1951). — WANNER, H.: Cytologische Analyse der Artbastarde *Primula (pulverulenta × Cockburniana)* und ihrer Eltern. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **16**, 495—557 (1941). — WELZEL, G.: Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an pollensterilen Mutanten von *Petunia*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **36**, 35—54 (1954). — WERGIN, W.: Cytogenetische Untersuchungen an *Petunia hybr. hort.* Genetische Untersuchungen über den Erbgang der Parasterilität und Cytologie der polyploiden Formen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **71**, 120—135 (1936).

ILSE MÜLLER, Institut für Entwicklungsphysiologie,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aus dem Max-Planck-Institut für physikalische Chemie Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. K. F. BONHOEFFER †)

UNTERSUCHUNGEN AN HETEROZYGOTEN DES PHAGEN T 1 *

Von

THOMAS A. TRAUTNER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Januar 1958)

Heterozygoten bei Phagen wurden zuerst von HERSHEY und CHASE (1951) für T 2 beschrieben: Infizierte man Bakterienzellen gleichzeitig mit dem Wildtyp T 2 r^+ und einer Mutante T 2 r und brachte die daraus hervorgehenden Phagen-nachkommen auf Platten, so fanden sich neben den Löchern der Parentaltypen solche, die nebeneinander segmentartig den Lochtypcharakter *beider* Elterntypen zeigten. Impfte man ein solches, als „mottled plaque“ bezeichnetes Loch ab, so zeigte sich bei erneutem Plattieren, daß aus jedem Mischloch beide ursprünglichen Parentaltypen hervorgingen. Durch ausführliche Kontrollversuche konnten HERSHEY und CHASE eindeutig nachweisen, daß ein derartiges Mischloch durch ein einziges Phagenpartikel hervorgerufen sein mußte, nicht etwa durch zwei zufällig aneinanderklebende Phagen. Dieses Partikel enthielt r -Gene beider Eltern (r und r^+), die sich bei Infektion einer Bakterienzelle voneinander trennten und beide Typen von Phagen hervorbrachten. Ohne Aussagen über ihre Struktur zu machen, wurden derartige Partikel in Analogie zu höheren Organismen als Heterozygoten bezeichnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit über Heterozygoten lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Bei Einfaktorkreuzungen vom Typ $r \times r^+$ wurde mit verschiedenen r -Mutanten, lokalisiert an mehreren Stellen des Lineoms¹, die gleiche Heterozygotie-Häufigkeit von 2% beobachtet.

2. Die Heterozygotie-Häufigkeit ist für ein Gen konstant 2%, unabhängig davon, ob die Zellen vor dem Ende der Latenzperiode künstlich zur Lyse gebracht wurden, ob sie zum normalen Zeitpunkt lysierten oder ob die Lyse verzögert wurde.

3. In Zweifaktorkreuzungen mit zwei ungekoppelten Genen tritt Heterozygotie für die beiden Gene praktisch unabhängig voneinander auf, d. h. unter den Heterozygoten für ein Gen wurden 3% gefunden, die auch für das andere Gen heterozygot waren (Doppelheterozygoten).

4. Bei Kreuzungen mit gekoppelten Genen werden doppelte Heterozygoten erheblich häufiger gefunden als im Fall von ungekoppelten.

LEVINTHAL (1954) setzte die Untersuchung der Heterozygoten fort, wobei zwei Fragen im Vordergrund der Diskussion standen: 1. die Struktur der Heterozygote, 2. die Rolle der Heterozygote bei der Rekombinantenbildung.

* Auszug aus einer Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen (1957).

¹ Nach einem Vorschlag von Prof. Dr. A. KÜHN, wird die Kopplungsgruppe eines Phagen als „Lineom“ bezeichnet.

Nach LEVINthal sind zwei mögliche Strukturen der Heterozygoten vorstellbar: entweder ist ein kleines Lineomstück an die Seite einer kompletten Struktur angelagert (Abb. 1a) (Anlagerungsheterozygote); oder es findet eine teilweise Überlappung von Lineomen zweier Eltern statt (Abb. 1b) (Überlappungsheterozygote).

Die Frage, welches der beiden Modelle in der Natur realisiert ist, kann durch eine Dreifaktorkreuzung mit gekoppelten Genen gelöst werden. Dabei müßten die Heterozygoten für das Mittelgen in Hinblick auf die Kombination der Endgene untersucht werden. Im Falle von 1a wären die Endgene vom gleichen Parentaltyp, im Fall von 1b wären sie rekombiniert von verschiedenen Eltern.

Zwei Schwierigkeiten treten bei der Durchführung solcher Dreifaktorkreuzungen auf: 1. müssen nach Möglichkeit solche Parentaltypen benutzt werden, die eine eindeutige Unterscheidung aller acht Typen einer Dreifaktorkreuzung ermöglichen; 2. muß berücksichtigt werden, daß nach der Theorie von VISCONTI und DELBRÜCK (1953) in einer phagenmischinfizierten Zelle bereits kurz nach der Infektion eine inhomogene Population von sich paarenden Partikeln, bestehend aus Parentalphagen und Rekombinanten vorliegt, so daß nur die ersten in der Latenzperiode gebildeten Heterozygoten ausschließlich aus Wechselwirkungen zwischen den ursprünglichen Parentaltypen entstehen, während an der Bildung späterer Heterozygoten in steigendem Maße Rekombinanten beteiligt sind. Dieser störende Einfluß wirkt sich besonders stark bei einem Phagen aus, dessen mittlere Paarungshäufigkeit der „Visconti-Delbrück-Theorie“ groß ist.

Die geschilderten Schwierigkeiten fallen nun bei den von LEVINthal benutzten Phagen T 2 stark ins Gewicht:

1. Ist eine eindeutige Unterscheidung aller Rekombinanten einer Dreifaktorkreuzung nicht möglich.

2. Ist der Anteil der aus Rekombinanten gebildeten Heterozygoten bei T 2 mit einer mittleren Paarungszahl von 5 sehr groß.

Trotz dieser Schwierigkeiten konnte LEVINthal eindeutig zeigen, daß alle Heterozygoten Überlappungsheterozygoten (s. Abb. 1b) waren, denn die Majorität der beobachteten Heterozygoten war rekombinant in bezug auf die Außengene (RH = Rekombinantenheterozygoten). Waren Heterozygoten in diesen Genen nicht rekombinant, so konnten sie quantitativ aus der Beteiligung von bereits gebildeten Rekombinanten an der Heterozygotenformation verstanden werden. Sie entsprechen ihrer Struktur nach ebenfalls Überlappungsheterozygoten, wenn sie auch auf Grund der genetischen Analyse Anlagerungsheterozygoten vortäuschen. Weil sie die Außengene von einem Parentaltyp tragen, sollen sie als PH (= Parentalheterozygoten) bezeichnet werden.

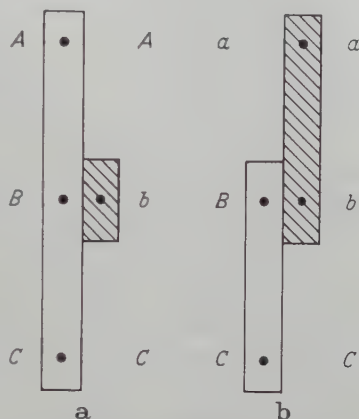


Abb. 1a u. b. Verschiedene Strukturmöglichkeiten von Heterozygoten (nach LEVINthal)

Die hier für T 2 geschilderten Schwierigkeiten sind bei Benutzung des Phagen T 1 erheblich vermindert: hier sind mehrere Dreifaktorkreuzungen möglich, in denen alle Rekombinanten voneinander unterschieden werden können. Außerdem werden weniger PH aus Rekombinantenbeteiligung gebildet, weil die mittlere Paarungszahl von T 1 um einen Faktor 10 kleiner ist als die von T 2 (MENNIGMANN 1957). Es erschien daher sinnvoll, Versuche zur Klärung der Struktur von Heterozygoten an diesem Phagen durchzuführen.

Versuche

Bakterien. *E. coli* B als Wirtsbakterium; *E. coli* B/1 als Indikatorbakterium bei der Plattierung.

Phagen. Verschiedene T 1-Phagenmutanten, beschrieben bei BRESCH und MENNIGMANN (1954).

Medium (Wachstums-, Adsorptionsmedium für Bakterien, Lysate usw.). Peptonwasser 2% (Merck) + 4 g NaCl/l („Bouillon“).

Platten. Hergestellt aus Trockennährboden der Firma Bram, Berlin-Lichterfelde, mit Zusatz von Glukose, Wasserblau und Alizarinengelb. Technik ausführlich beschrieben bei BRESCH und TRAUTNER (1955).

Kreuzungen. Zu 1 ml einer wachsenden Bakterienkultur, durch Zentrifugation und Wiederaufnahme in frischer Bouillon zu einem Titer von $3-5 \times 10^8$ angereichert, wurde 1 ml einer Phagenmischung gegeben, die zu gleichen Teilen beide Parentaltypen enthielt (Phagentiter $3-9 \times 10^9$ je Typ). Nach 4 min Adsorption bei 37°C wurde die Kreuzungsmischung 1:6 in warme Bouillon verdünnt und zur Beseitigung der freien Phagen zentrifugiert. Das in ursprünglichen Kreuzungsvolumen (2 ml) aufgenommene Sediment infizierter Bakterienzellen enthielt weniger als 1% freie Phagen. Darauf wurde sofort um einen Faktor 1000 in Bouillon verdünnt, um Readsorption zu verhindern. Gleichzeitig wurde eine Probe auf Platten gebracht, um den Anteil von mischinfizierten Zellen, der ein Maßstab für die Adsorption bei der Kreuzung ist, zu bestimmen (Methode von BRESCH, zitiert bei MENNIGMANN). Alle diese Prozeduren waren einige Minuten vor Ablauf der minimalen Latenzperiode von T 1 beendet.

Das Versuchsröhrchen mit den infizierten Zellen wurde zur Lyse der Bakterien 40 min bei 37°C gehalten, und sein Inhalt sodann membranfiltriert. Der Phagentiter des filtrierten Lysates war um einen Faktor von 10—20 gegenüber dem ursprünglichen reduziert.

Plattierung. Das Kreuzungslysate wurde mit B und B/1 auf Platten gebracht und nach 20 Std Bebrütung ausgewertet. Die Plattierung erfolgte in einer Verdünnung derart, daß die Zahl der Phagenlöcher auf den Platten stets zwischen 80 und 120 lag, so daß praktisch keine durch zufälliges Ineinanderliegen zweier Löcher vorgetäuschte Heterozygoten auftreten konnten.

Auswahl der Gene. Von den bisher bei T 1 lokalisierten Genen (s. Abb. 2) ist das Gen *Hr* wegen der leichten Identifizierbarkeit des dadurch hervorgerufenen „host-range“-Merkmals für Heterozygotenuntersuchungen besonders geeignet. Farbphotos derartiger Heterozygoten sind bei BRESCH und TRAUTNER (1956) abgebildet.

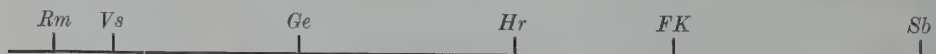


Abb. 2. Lineom von T 1 (relative Genabstände)

Mit *Hr* als Mittelgen wurden also die folgenden Dreifaktorkreuzungen durchgeführt:

1. mit größtmöglichem Abstand der Seitengene:

$$Rm^+Hr Sb \times Rm Hr^+Sb^+ \quad (1a)$$

$$Rm^+Hr Sb^- \times Rm Hr^+Sb \quad (1b)$$

2. mit kleinstmöglichem Abstand der Seitengene:

$$Ge^+Hr Fk \times Ge Hr^+Fk^+ \quad (2a)$$

$$Ge^+Hr Fk^+ \times Ge Hr^+Fk \quad (2b)$$

In den beiden Gegenkreuzungen jeder Gruppe (a und b) treten Heterozygoten mit gegebenen Außengenkombinationen jeweils in einem Fall als PH im anderen Fall als RH auf. Wenn in beiden Gegenkreuzungen die relative Häufigkeit von PH und RH gleich ist, so wäre hierdurch der Einwand widerlegt, daß der gefundene Prozentsatz durch unterschiedliche Erkennbarkeit von verschiedenen Typen verfälscht wird. Die Levinthalschen Ergebnisse waren gegen diesen Einwand nicht völlig abzusichern.

Analyse der Heterozygoten. Die Morphologie des Heterozygotenloches wird bestimmt durch die bei der Infektion eines Bakteriums mit einer Heterozygote entstehenden Segregationsphagen. Die *Hr*-Heterozygoten aus allen Kreuzungen erscheinen als breitrandige, trübe Ringe (Charakter bestimmt durch den *Hr*⁺ Segreganten) mit einem konzentrischen, klaren Innenkreis bedingt durch die Anwesenheit des *Hr*-Typs unter den Segreganten. Es war nicht immer möglich, aus dem bloßen Betrachten von Heterozygotenlöchern die an der Heterozygote beteiligten Außengene eindeutig zu bestimmen. Deswegen wurden sämtliche Heterozygotenlöcher abgeimpft und zur Analyse der in der Heterozygote enthaltenen Gene verdünnt erneut auf Platten gebracht. In den Kreuzungen der Gruppe 2 war stets aus diesen Abimpfungsplatten eine eindeutige Bestimmung der Außengene möglich. Bei Gruppe 1 mußten jedoch zur Bestimmung des Charakters der Segregationsphagen diese auf *einer* Platte mit genetisch bekannten Phagen verglichen werden. Wenn z. B. eine Heterozygote $Rm^+ \begin{smallmatrix} Hr \\ Hr^+ \end{smallmatrix} Sb$ auf *Sb* oder *Sb*⁻ geprüft wurde, mußten Proben der Abimpfung mit 4 verschiedenen Typen (*Hr*⁻*Sb*⁺, *Hr* *Sb*⁺, *Hr*⁺*Sb*, *HrSb*) auf vier verschiedene Platten gebracht werden. Aus dem unmittelbaren Vergleich von bekannten und unbekannten Phagen auf einer Platte war auch hier immer eine eindeutige Erkennung der in der Heterozygote enthaltenen Gene möglich. Diese vollständige genetische Bestimmung gelingt jedoch nur für Heterozygoten, die im *Rm*-Locus (Kreuzungsgruppe 1) bzw. im *Ge*-Locus (Kreuzungsgruppe 2) das Wildallel tragen. Die entsprechenden Heterozygoten-Typen, die *Rm* bzw. *Ge* enthalten, sind weder eindeutig als Heterozygoten erkennbar, noch ist die Analyse ihrer Genzusammensetzung mit Sicherheit durchführbar.

Ergebnisse und Auswertung

Im Verlaufe dieser Untersuchungen wurden insgesamt 43 Kreuzungen durchgeführt, von denen jedoch nur solche mit genügend hohen Heterozygotenprozent-sätzen (mehr als 0,1%) für eine statistische Untersuchung benutzt wurden.

Ein Teil der Platten jeder Kreuzung wurde zur Bestimmung des Rekombinan-tenprozentsatzes ausgezählt, wobei sich eine gute Übereinstimmung mit den von MENNIGMANN ermittelten Werten ergab.

Es wurden rund 450 Heterozygoten gefunden, abgeimpft und bestimmt. In Tabelle 1 sind jedoch nur die 314 Heterozygoten erfaßt, in denen das linke Seitengen im Wildzustand vorlag. Die Gesamtzahl der nicht protokollierten doppelten bzw. dreifachen Heterozygoten betrug 31 bzw. 7.

Tabelle 1

Kreuzung	RH	PH	RH+PH	PH/RH+PH	Mittelwert
1a	110	40	150	0,267	0,28
1b	39	18	57	0,315	
2a	53	8	61	0,131	0,13
2b	40	6	46	0,130	

Wir können diesen Daten zunächst zwei wichtige Ergebnisse zur Kreuzungstechnik entnehmen:

1. Der sehr niedrige Anteil von dreifachen Heterozygoten beweist, daß die Membranfiltra-

tion des Kreuzungslysates so gut wie quantitativ alle eventuell unlysierten Zellen oder zufällig an Bakterientrümmern adsorbierte Phagen zurückhält, die Heterozygoten vortäuschen könnten.

2. Die Gleichheit des Anteiles der PH — im Rahmen der allerdings kleinen Statistik — in den Kreuzungen a und b jeder Gruppe zeigt, daß dieser Wert real ist und nicht durch verschiedene Erkennbarkeit unterschiedlicher Heterozygoten verfälscht ist (!).

Wie bereits diskutiert wurde, entstehen PH nach LEVINTHALS Vorstellungen ausschließlich durch Paarungen zwischen Parentaltypen und bereits vorher gebildeten Rekombinanten. Es muß zunächst dieser Anteil von PH für die durchgeführten Kreuzungen ermittelt werden.

Es konnte von BRESCH und TRAUTNER (1955) gezeigt werden, daß die Paarungswahrscheinlichkeit $W(t)$ der vegetativen Partikel während der ganzen Latenzperiode als konstant anzusehen ist, obgleich — zumindest zu Beginn der Latenzperiode — die „pool“-Größe ansteigt. Damit wird $W(t)$ unabhängig von der Konzentration der betreffenden Partikel und nur eine Funktion deren relativer Häufigkeit im pool. Mit diesen Voraussetzungen ermöglicht die Visconti-Delbrück-Theorie die Bestimmung des zu jedem Zeitpunkt der Latenzperiode im pool vorhandenen Rekombinantenprozentsatzes.

Das Produkt der Anteile zweier Partikel an der Gesamtpopulation des pools ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ihres Zusammentreffens. Unter der Annahme, daß Heterozygoten durch das Zusammenwirken je zweier Partikel gebildet werden, ist dieses Produkt gleichzeitig ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Bildung der betreffenden Heterozygote. Die mathematische Durchführung dieses Gedankenganges ist aus dem Anhang dieser Arbeit ersichtlich. Die numerische Auswertung liefert Erwartungswerte für die Anteile der PH an allen Heterozygoten von

0,064 für Kreuzungsgruppe 1 (*Rm Hr Sb*)

0,022 für Kreuzungsgruppe 2 (*Ge Hr Fk*).

Vergleicht man diese Werte mit den entsprechenden Daten von Tabelle 1, so wird ersichtlich, daß die experimentell gefundenen Werte für die Anteile der PH die nach LEVINTHAL zu erwartenden in beiden Kreuzungen außerhalb jeden statistischen Zweifels überschreiten:

Wir finden im Fall der Kreuzungsgruppe 1 einen Anteil von 0,22 PH, der Kreuzungsgruppe 2 von 0,11 PH, der sich nicht durch Rekombinantenbeteiligung an der Heterozygotenbildung erklären läßt. Diese Heterozygoten müssen in einem Paarungsakt zwischen Parentaltypen entstanden sein, was nur dadurch möglich ist, daß in dem gleichen Paarungsakt, der zur Bildung der Heterozygote führt, eine Rekombination erfolgt zwischen dem Mittelgen und einem Seitengen. Solche Heterozygoten sind eine Untergruppe der nicht für am Ende gelegenen Gene rekombinierten PH — nach einem Vorschlag von DELBRÜCK sollen sie als PPH (Pseudo-Parentalheterozygoten) bezeichnet werden. Unter der Annahme, daß der geschilderte Rekombinationsmechanismus dem ohne beobachtete Heterozygotie gleicht, muß der Anteil der in einem Paarungsakt entstandenen PPH der Austauschwahrscheinlichkeit zwischen Mittel- und einem Seitengen entsprechen. Das heißt, wenn wir eine Dreifaktorenkreuzung allgemein als

$$111 \times 222$$

bezeichnen, und mit p_{23} die Austauschwahrscheinlichkeit zwischen Mittel- und rechtem Seitengen, so muß sein:

$$\frac{1 \frac{1}{2} 1}{1 \frac{1}{2} *} \approx p_{23}.$$

Diese Erwartung wird durch experimentelle Befunde bestätigt, denn es ist bei Kreuzungsgruppe 1:

$$\frac{1 \frac{1}{2} 1}{1 \frac{1}{2} *} = 0,22 \approx p_{23} = p_{HrSb} = 0,24,$$

bei Kreuzungsgruppe 2:

$$\frac{1 \frac{1}{2} 1}{1 \frac{1}{2} *} = 0,11 \approx p_{23} = p_{HrFK} = 0,10.$$

Da es sehr unwahrscheinlich ist, daß beim Phagen T 2 ein prinzipiell anderer Heterozygoten-Bildungsmechanismus vorliegt als bei T 1, stellen wir uns vor, daß auch hier PPH entstehen. Jedoch ist bei T 2 mit einer mittleren Paarungszahl von 5 dieser Anteil von PPH an den PH so gering, daß er in der Ungenauigkeit der Korrektur für PH-Bildung aus Rekombinantenpaarungen nicht erkennbar ist.

Wir können somit aus den durchgeführten Versuchen zu folgenden Schlußfolgerungen kommen:

1. Der überwiegende Teil von Heterozygoten mit Außengenen von einem Parentaltyp entsteht wie die RH primär aus Paarungen von Parentaltypen (PPH).

2. Der Prozentsatz dieser in einem Paarungsakt zwischen Parentalphagen gebildeten PPH entspricht der Austauschwahrscheinlichkeit zwischen Mittel- und Seitengen.

Anhang

Berechnung der Korrektur für Rekombinanten-Beteiligung an der Heterozygoten-Bildung. Eine Heterozygote $1\frac{1}{2}^*$ kann entweder parental, d. h. $1\frac{1}{2}1$ oder rekombinant, also $1\frac{1}{2}2$ sein.

Zu jedem der beiden Fälle gehören zwei mögliche Entstehungsbilder (nach LEVINTHAL):

P: 1.	12*	R: 1.	*12
	11		12
2.	11*	2.	11*
	*21		*22

Die Paarungswahrscheinlichkeit zwischen den erforderlichen Typen ist zu einem Zeitpunkt m während der Latenzperiode unter Berücksichtigung der Visconti-Delbrück-Theorie (Gleichung 10b)

für die PH:

$$16 w_p(m) = (1 - e^{-m p_{12}}) \cdot (1 + e^{-m p_{23}}) + (1 + e^{-m p_{12}}) \cdot (1 - e^{-m p_{23}})$$

für die RH:

$$16 w_r(m) = (1 - e^{-m p_{12}}) \cdot (1 - e^{-m p_{23}}) + (1 + e^{-m p_{12}}) \cdot (1 + e^{-m p_{23}})$$

Oder vereinfacht:

$$8 w_p(m) = 1 - e^{-m(p_{12} + p_{23})}$$

$$8 w_r(m) = 1 + e^{-m(p_{12} + p_{23})}$$

Die Gesamtwahrscheinlichkeit der Bildung der betreffenden Heterozygoten ergibt sich daraus durch Integration über m von 0 bis m_0 ; wobei m_0 die mittlere Paarungszahl des Phagen ist. In unserem Falle ist $m_0 \approx 1/2$.

$$8 W_p(m) = \int_0^{\frac{1}{2}} 1 - e^{-m(p_{12} + p_{23})} dm$$

$$8 W_r(m) = \int_0^{\frac{1}{2}} 1 + e^{-m(p_{12} + p_{23})} dm$$

Daraus ergibt sich

$$W_p \sim \frac{1}{2} + \frac{1}{p_{12} + p_{23}} [e^{-(p_{12} + p_{23})/2} - 1]$$

und

$$W_r \sim \frac{1}{2} - \frac{1}{p_{12} + p_{23}} [e^{-(p_{12} + p_{23})/2} - 1]$$

Die numerische Auswertung mit den Mennigmannschen Daten für m , p_{12} , p_{23} liefert:

$$Rm Sb: \frac{W_p}{W_r + W_p} = 0,064; Ge Fk: = 0,022.$$

$$(p_{Rm Sb} = 0,55; p_{Ge Fk} = 0,23; m = 0,5).$$

Summary

To investigate heterozygosity in T 1 phage, various three factor crosses were performed. Heterozygotes for the middle markers were selected and the combination of their side markers analysed. Such markers can either be contributed to the heterozygote from one and the same or from both types of the cross. The relative frequencies of such heterozygotes in the progeny of a cross allow conclusions as to the possible genetical structure of heterozygotes.

The following results were obtained:

1. As LEVINthal had shown for T 2, the majority of heterozygotes were recombinants with respect to their side markers.
2. Among the heterozygotes nonrecombinant for the side markers only a small fraction could be accounted for by the participation of recombinants in their formation. The majority of such heterozygotes with a parental combination of markers arose from matings between parental structures.
3. The fraction of such nonrecombinant heterozygotes from matings between parental types was proportional to the distance between the middle and side markers employed in the cross.

The structure of a heterozygote to satisfy the experimental results equals the one previously suggested by LEVINthal in so far as it is haploid, with diploidy due to an overlap in the heterozygous region. It, however, differs from LEVINthal's model as it can carry a recombination in the haploid region as a result of a recombination act which had occurred during the establishment of heterozygosity in the phage concerned.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde durch das großzügige Entgegenkommen des verstorbenen Direktors des Max-Planck-Institutes für physikalische Chemie, Prof. Dr. K. F. BONHOEFFER und durch eine Sachbeihilfe der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ ermöglicht. Folgenden Professoren danke ich: Dr. A. RIPPEL für sein stets förderndes Interesse, Dr. C. BRESCH für laufende Beratungen bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung des mathematischen Anhangs, Dr. M. DELBRÜCK und Dr. C. LEVINthal für anregende Diskussionen der gewonnenen Ergebnisse. — Fräulein O. KRÜGER bin ich dankbar für gewissenhafte technische Assistenz.

Literatur

BRESCH, C., u. H. D. MENNIGMANN: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T 1 Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **9b**, 212—215 (1954). — BRESCH, C., u. TH. TRAUTNER: Zur Kinetik der Rekombinantenbildung bei T 1 Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **10b**, 436—440 (1955). — Die Bedeutung des Zweifarb-Nährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T 1. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 590—594 (1956). — HERSHEY, A., u. M. CHASE: Genetic recombination and heterozygosity in bacteriophage. *C. S. H. S. Q. B.* **16**, 471—479 (1951). — LEVINthal, C.: Recombination in phage T 2: its relationship to heterozygosity and growth. *Genetics* **39**, 169—184 (1954). — MENNIGMANN, H. D.: Zur Genetik des Bakteriophagen T 1. Diss. Göttingen 1955. — VISCONTI, N., u. M. DELBRÜCK: The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics* **38**, 5—33 (1953).

Dr. THOMAS A. TRAUTNER, Köln-Lindenthal, Mikrobiol. Abteilung,
Botanisches Institut der Universität, Gyrhofstr. 17

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern

DIE VARIABILITÄT DER MANIFESTATION DER MUTANTE *PEARL* (Pl)
VON *DROSOPHILA MELANOGASTER**

Von

WALTER NEF

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Dezember 1957)

Einleitung

Bei jeder neuen Mutante, oder einer noch wenig untersuchten wie der unseren, stellt sich die Aufgabe, ihre erkennbaren Phäne eingehend zu beschreiben. Im allgemeinen stützt sich eine solche Phänanalyse auf Zuchten, die unter den üblichen Milieubedingungen gehalten wurden. Wird zudem die Abhängigkeit der betreffenden Genmanifestation vom Milieu, etwa von der Entwicklungstemperatur oder vom übrigen Genom, in die Beschreibung einbezogen, sind meist ausschließlich die deutlich abgeänderten Merkmale betrachtet, dagegen allgemeine Entwicklungsmerkmale wie Entwicklungs-Geschwindigkeit und Körpergröße, die ebenfalls milieuhängig sind und die Genmanifestation möglicherweise beeinflussen, gänzlich vernachlässigt. Dies hat seinen Grund darin, daß in diesem ersten Schritt vor allem die Ausstellung eines Steckbriefes der Mutante beabsichtigt ist. Die im Vordergrund des Interesses stehenden Einblicke in die zu den abweichenden Bildungen führenden entwicklungsphysiologischen Vorgänge und damit in das normale Entwicklungsgeschehen des Organismus, werden jedoch zum vornherein auf anderen Wegen gesucht. Zu diesen gehören vor allem eine histologische Durcharbeitung der verschiedenen Entwicklungsstadien und das Studium der physiologischen Merkmale. Ferner ist der direkte Eingriff in den lebenden Organismus, insbesondere die weit entwickelte Transplantationstechnik geeignet, Licht in verborgenste Vorgänge zu werfen.

Im Gegensatz zu dieser üblichen Arbeitsweise, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Tiere vollkommen ungestört ihrer Entwicklung überlassen. „Ungestört“ bedeutet, daß die gebotenen Milieubedingungen stets in einem durch aus biologischen Bereich lagen, und daß sie zudem in den Hauptversuchen während der gesamten Entwicklungsdauer der Tiere unverändert blieben. Einblicke in das Entwicklungsgeschehen werden also in einer rein betrachtenden Analyse — und zwar einzig der imaginalen Phäne — gesucht, in die allerdings allgemeine Entwicklungsmerkmale wie Schlüpftrate, Entwicklungsdauer und Körpergröße einbezogen werden. Es ist selbstverständlich, daß die überhaupt möglichen Aufschlüsse in bezug auf Entwicklungsvorgänge bei dieser Arbeitsweise sehr beschränkt sind. Das Entwicklungsgeschehen kann grundsätzlich nur soweit erfaßt werden, als es sich in Korrelationen im Manifestationsmuster des mutierten Genes oder in Korrelationen zwischen Milieubedingungen, allgemeinen Entwicklungsgrößen und mutativen Merkmalen widerspiegelt. Die Betrachtung solcher

* Ausgeführt mit Unterstützung durch die Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Bernischen Hochschule.

Korrelationen verlangt im allgemeinen ein sehr großes Tiermaterial, im Vergleich etwa zur Deutung operativer Wirkungen, die oft schon an Hand weniger Einzelfälle gelingt. Die Forderung großer Individuenzahlen erwächst einerseits aus der bedeutenden, normalen Variabilität des lebenden Materials, andererseits ist sie mitbedingt durch die große Schwierigkeit, konstante Bedingungen des Außen- und Innenmilieus der Tiere zu schaffen, u. a. überhaupt sämtliche wirksamen Milieufaktoren zu erkennen und zu kontrollieren. Jeder biologische Versuch bedeutet deshalb ein Ringen um die Homogenität, das in unserm Falle, sowohl in der Zucht- wie in der Auswertemethodik, einen breiten Raum beanspruchte. Schließlich gesellt sich zu den beiden angeführten Komponenten der Variabilität eine dritte, die auf dem eigentlichen Experiment, d. h. auf der gewollten Veränderung der Versuchsbedingungen, beruht.

Aus dem oben Dargelegten ist ersichtlich, daß eine Untersuchung wie die unsere vor allem eine Analyse biologischer Variabilität sein muß, die eine weitgehende Anwendung statistischer Methodik erfordert. Der damit vorgezeichnete Weg wurde in dieser Untersuchung beschritten. Man mag sich fragen, wie lohnend ein solcher Weg in Anbetracht seiner Länge und Beschwerlichkeit ist. Für uns liegt seine Bedeutung weniger in den gefundenen Ergebnissen, als in den zahlreichen, wertvollen Ausgangspunkten und Hinweisen für die weitere Bearbeitung unserer Mutante und nicht zuletzt in der eindrucklichen Begegnung mit der Variabilität und Komplexität des Phänomens Leben.

Herrn Prof. S. ROSIN, unter dessen Leitung diese Arbeit entstanden ist, danke ich herzlich für all das, was so wesentlich beitrug zur Fülle dieser Studienjahre.

A. Material und Methoden

I. Die Mutante *Pearl* (*Pl*)

Die Mutante *Pearl* (*Pl*) ist 1948 im Zoologischen Institut Bern spontan aufgetreten. Zu Beginn dieser Arbeit war folgendes über sie bekannt (ROSIN 1951a): Sie beruht auf einem dominanten Gen, das im II. Chromosom liegt, ungefähr bei Locus 10. Homozygot wirkt das Gen letal im späten Larven- bis frühen Puppenalter. Die (heterozygoten) Imagines zeichnen sich durch verschiedenartige Flügeldefekte, fehlende Thorakalborsten und verhältnismäßig kleine Augen mit unregelmäßigen Fazetten aus. Die Flügeldefekte setzen sich aus den für diese Mutante spezifischen Perlen (inversen Bläschen aus Flügelepithel mit nach innen gerichteten Cuticularhärchen), sowie flüssigkeitsgefüllten Blasen, Verzweigungen und Deltabildungen der Adern und Ausschnitten des Flügelrandes zusammen. Die Ausfallhäufigkeit für die verschiedenen Borsten wechselt stark. Die Ausbildung all dieser Defekte ist außerordentlich temperaturabhängig. So variiert die Penetranz der Flügelperlen von 0 % bei 18° bis 100 % bei 31° C. Parallel damit variiert auch die Expressivität, so z. B. die mittlere Zahl der fehlenden Borsten von 0,01 je Tier bei 18° bis 3,4 bei 31° C. Für die *Pl*-Manifestation existiert eine temperaturempfindliche Phase, die für Flügeldefekte und Borstenausfälle zusammen von etwa einem halben Tag vor bis höchstens einem halben Tag nach der Verpuppung¹ dauert.

¹ Mit dem hier oft wiederkehrenden Wort „Verpuppung“ ist ausnahmslos die Bildung des Pupariums gemeint; dementsprechend bedeutet Puppendauer auch immer die Entwicklungsdauer von Vorpuppe und Puppe zusammen, d. h. die von der Pupariumbildung bis zum Schlüpfen der Imagines verstrichene Zeit.

II. Methoden

1. Die Temperaturbedingungen

Die Stammzuchten sowie die Eltern der zu untersuchenden Tiere wurden in einem der gebräuchlichen Luftthermostaten bei etwa 25° C gehalten. Für die Aufzucht der Versuchstiere erwiesen sich diese jedoch wegen der auffallenden Temperaturabhängigkeit der Mutante als ungenügend. Die Versuchstiere wurden deshalb spätestens nach beendeter Embryonalentwicklung in Wasserbad-Thermostaten gehalten, deren Eigenschaften eine von störenden Temperaturschwankungen freie Entwicklung der Fliegen garantieren. Eingehende Prüfungen der Bäder ergaben nämlich, daß die größten räumlichen und zeitlichen Abweichungen von der eingestellten Temperatur zwischen 18 und 28° C auch unter ungünstigsten Bedingungen (einseitige Benützung des Bades, niedere Labortemperatur, Zugluft) stets kleiner als $\pm 1/10^{\circ}$ C bleiben. Damit war, zusammen mit einem Minimum-Maximum-Thermometer zum Feststellen allfälliger Betriebsstörungen (z. B. Stromunterbrüche), die Temperatur als Fehlerquelle in den Versuchen zum Vorneherein ausgeschaltet.

Bei Temperaturversuchen wurden gleichzeitig bis drei Wasserbäder benützt, die sich lediglich in ihrer Größe, der Anordnung der Heizelemente und im Rührer unterscheiden. Da es sich um Eigenkonstruktionen handelt, seien sie im folgenden kurz beschrieben. Es sind Rahmenaquarien bis zu 100 Litern Inhalt, mit gazebespannten Deckeln zur Herabsetzung der Verdunstung ohne Kondenswasserbildung. Der über dem Aquarienboden montierte „Heizrost“ besteht aus mehreren Salzwasser-Heizrohren, an die mittels spezieller Drahtbügel zudem die Zuchtflaschen eingehängt werden; diese stehen dann dank ihres Auftriebes senkrecht im Wasser. Rührwerke wurden verschiedene, je mit etwa 30 W Leistung, eingebaut. Als Temperaturregler dienen dagegen ausschließlich Fribos-Kontaktthermometer (0—50° C, mit $1/50^{\circ}$ -Teilung) mit Fibros-Relais T₁ (Schaltleistung bis 400 W), die sich als sehr zuverlässig erwiesen haben. Die Wassertemperatur läßt sich mittels eines Stabthermometers in Ölbad genau einstellen, der ständigen Kontrolle dienen Minimum-Maximum-Thermometer. Schließlich sind die Bäder mit einem Aqua dest.-Reservoir verbunden und besitzen je einen Überlauf.

2. Futter und Zuchtgläser

a) Das „gewöhnliche“ Futter. Die Stämme wurden in *Drosophila*-Standard-Flaschen mit dem hier seit langem gebräuchlichen Futter gehalten. Dieses setzt sich zusammen aus

100 cm ³	Agar 2%
200 cm ³	Brunnenwasser
20 g	Zucker (Saccharose)
40 g	Maisgrieß
etwa 5 g	Bäckerhefe.

Nach Erkalten des Breies wird die Oberfläche mit einer Aufschwemmung von Bäckerhefe geimpft. Die unter b) angegebene Nipagin- und Terramycin-Behandlung wird bei den Stämmen prinzipiell unterlassen, um eine Selektion unempfindlicher Pilze und Bakterien oder eine Immunisierung dieser Organismen auszuschalten.

b) Die „Normalflaschen“ der Versuche. Die Futterzusammensetzung ist ähnlich wie unter a): lediglich die 5 g Frischhefe sind durch 20 g Trockenhefe (Faex medicinale), also eine viel reichlichere Hefemenge, ersetzt. Der Brei wird in Zylindergläser von etwa 18½ mm Innendurchmesser und 10 cm Höhe 19 mm hoch eingefüllt; dies ergibt eine Futtermenge von ungefähr 12 cm³, was beim angegebenen Hefegehalt (etwa 0,6 g je Zucht) und einer Population von etwa 100 Larven eine normale Entwicklungsdauer der Tiere gewährleistet. Die mit Watte verschlossenen Gläser werden dann im Autoklaven durch einmaliges

Erhitzen auf 125° sterilisiert. Nach dem völligen Erkalten der Flaschen folgt die Zugabe von je $\frac{1}{10}$ cm³ Nipaginlösung (0,2 g Nipagin in 1 cm³ reinem Alkohol 100%) und nach einer weiteren Stunde von je $\frac{1}{4}$ cm³ Terramycinlösung¹ (200 γ Terramycin in 1 cm³ Aqua dest.). Diese Substanzen dienen der Bekämpfung von Schimmelpilzen bzw. Bakterien, die durch die Fliegeneier eingeschleppt werden können. Nach $\frac{1}{2}$ —1 Tag Lagerung bei 25° (zum Eindringenlassen des Terramycins) wird das Futter mit einem Filtrierpapierstreifen von 14 $\times$ 75 mm belegt, was sich vor allem dann günstig auswirkt, wenn der Brei zu naß wird (etwa bei hoher Luftfeuchtigkeit). Damit sind die einigermaßen sterilen Zuchtgläser zur Aufnahme der Eier bereit.

c) *Abgeänderte Futtertypen.* In den Hauptversuchen wurden neben dem soeben angegebenen Normalfutter verschiedene Stufen von Mangelfutter verwendet, die sich lediglich in ihrem Hefegehalt unterscheiden. Ferner wurde dem Futter in einigen Serien „Vitamin T“ (GOETSCH 1949) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Das flüssige, nicht näher umschriebene, uns von Prof. GOETSCH 1949 überlassene und seitdem ständig bei etwa 5° C aufbewahrte Vitamin T wurde unverdünnt in den frisch in die Zuchtflaschen eingefüllten Brei eingerührt. (Die beiden Versuche, in denen Vitamin T verwendet wurde, fanden Ende 1954 und Anfang 1955 statt.) Eine Zusammenstellung sämtlicher verwendeter Futtertypen findet sich auf S. 279.

3. Zucht und Fixierung der Fliegen

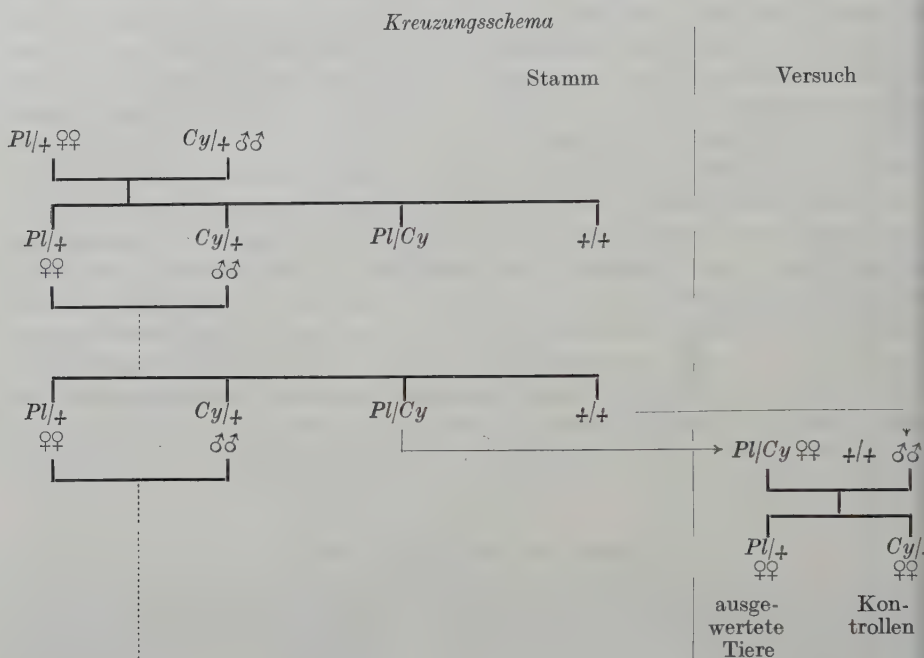
a) *Der Pl-Stamm.* Zuerst ist das *Pl*-Gen in Form eines mit *Cy* balancierten Stammes gehalten worden: die beiden homozygoten Typen *Pl/Pl* und *Cy/Cy* sind letal, so daß stets nur die doppelt Heterozygoten auftreten, die sich durch wahlloses Umsetzen weiterzüchten lassen. Später wurde der Stamm als „spaltende Inzuchtlinie“ nach FISHER (1949) weitergeführt, und zwar während 30 Generationen (bis Oktober 1952). Es handelt sich dabei um fortgesetzte Einzelpaarzucht, die eine rasche Homozygotisierung des Materials zur Folge hat (nach 30 Generationen dürften mindestens 99 $\frac{1}{2}$ % der anfänglich heterozygoten Loci homozygot sein). Da zudem stets nach dem Schema *Pl/+* $\times$ *Cy/+* gekreuzt wird, ist es jederzeit möglich, die Mutante mit der Wildform zu vergleichen, und zwar eben bei weitgehender Übereinstimmung des übrigen Genoms.

Seither wurde der Stamm nur noch durch Massenzuchten weitergeführt, unter Beibehaltung der obigen Kreuzungsart. Der Stamm enthält also gleichzeitig *Pl/+*, *Pl/Cy*, *Cy/+* und *+/+* Tiere, die bei normalen Zuchtbedingungen alle voneinander unterscheidbar sind. *Cy* war dabei einzig für die Versuchszuchten wichtig (siehe b) und für die Homogenität des Stammes bedeutungslos. Hingegen ist es möglich, daß in der Massenzucht-Phase aufgetretene Mutationen zu einer wenn auch geringen Verschlechterung der Homogenität führten. [Bis zum letzten Versuch (März 1955) waren es insgesamt 56 Massenzucht-Generationen.]

b) *Die Versuchskreuzung.* Als Eltern der zu untersuchenden *Pl*-Tiere wurden die *Pl/Cy* ♀♀ und *+/+* ♂♂ desselben *Pl*-Stammes gewählt (vgl. Schema); in den Versuchszuchten schlüpften also *Pl/+* und *Cy/+* Tiere. Die Markierung der Nicht-*Pl*-Individuen mit *Cy* diente ihrer sicheren Unterscheidung von den *Pl*-Geschwistern, die besonders bei niedriger Temperatur zum Teil keine sichtbaren Defekte aufweisen, währenddem die *Cy*-Tiere unter sämtlichen angewandten Zuchtbedingungen ausnahmslos die typisch aufgebogenen Flügel haben. Ferner

¹ Herrn Dr. GÜBLER (Landwirtschaftliche Versuchsanstalt Liebefeld), der mittels geeigneter Tests die Wahl des Antibiotikums traf und uns dieses nebst Dosierungsvorschriften zur Verfügung stellte, möchte ich auch hier noch einmal herzlich danken.

besteht bei dieser Art der Versuchskreuzung die Möglichkeit, die *Pl*- mit Nicht-*Pl*-Tieren zu vergleichen, die sich unter genau denselben äußeren Bedingungen entwickelt haben und auch in bezug auf das genetische Milieu gleich sind.



c) *Das Fixieren der Tiere.* Die Fliegen wurden in Äther narkotisiert und dann durch Übergießen mit heißem Alkohol 70% (70–80° C) getötet (ROSIN 1951 b) und aufbewahrt. Bei so fixierten Tieren sind die Flügel leicht seitwärts gespreizt und liegen ungefähr in derselben Ebene, was für unsere Zwecke optimale Betrachtungsverhältnisse für Flügel und Thorax ergab.

4. Eiablage und Behandlung der Eier

a) *Die Eiablage.* Die innerhalb von höchstens 3 Tagen gewonnene und durchschnittlich etwa 5 Tage alte, aus zwei Dritteln Weibchen und einem Drittel Männchen bestehende Elternpopulation wurde ohne Narkose in einen speziellen großen Legekäfig (Abb. 1) gebracht, in dem bedenkenlos bis etwa 1000 Tiere miteinander gehalten werden können. Der darin gebotene Brei ist zuvor sehr stark mit Bäckerhefe geimpft und während eines ganzen Tages bei 25° angegoren worden; zudem wurde das Futter spätestens nach je 10 Std durch frisches ersetzt. Dadurch ließen sich die in bestem Zustand befindlichen Weibchen zu gleichmäßiger, voller Legetätigkeit anregen (Ablagetemperatur ebenfalls 25° C). Für die Versuche fand frühestens die zweite Eiablage Verwendung, um möglichst wenig verzögert abgelegte Eier zu erhalten. Ferner erstreckte sich diese Ablage aus Gründen der Homogenität nur über 4 Std; falls die Eier nicht ausreichten, wurde der Versuch aus zwei aufeinanderfolgenden Ablagen angesetzt.

b) *Das Säubern der Eier.* Spätestens 10 Std nach Ablagebeginn wurde die gedeckte und bei 25° aufbewahrte Ablageschale mit Wasser gespült und die Hefe-Eier-Aufschwemmung ins Waschrohr (Abb. 2) abgegossen. Nach Ablassen des Wassers wurde gesättigte NaCl-Lösung eingefüllt und kräftig durchgeschüttelt. Danach sinken vorhandene Futterteilchen auf das Eiersieb, währenddem die spezifisch leichten Eier ziemlich rasch an die Oberfläche aufsteigen. Soweit stammt die Trennungsmethode von CLARK (1948). Durch Verwendung eines relativ engen Waschgefäßes war es zudem möglich, hierauf das Sieb abzunehmen

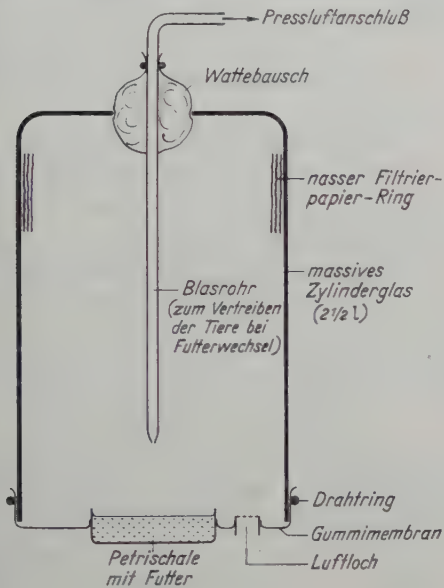


Abb. 1

Abb. 1. Käfig für große Eiablagen (mit auswechselbarer Futterschale)

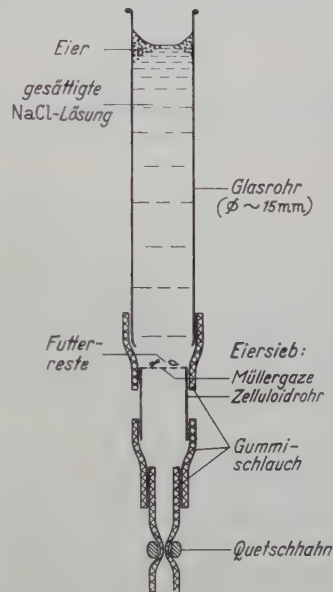


Abb. 2

Abb. 2. Eier-Waschrohr

und zu spülen, da sich die Eier am Rand des Meniskus ansammeln und beim Ablassen der Salzlösung am Glas hängen bleiben. Die Waschung mit NaCl-Lösung ließ sich deshalb auch ohne Sieb mehrmals wiederholen. Nach Wiedereinsetzen des gereinigten Siebs wurde ein paar Male unter kräftigem Schütteln mit Wasser gespült und dann das Sieb mit den sauberen Eiern (bis 5000) herausgenommen. Um allfällige Kälteschäden bei den Eiern auszuschließen, wurde Aqua dest. und Salzlösung aus Vorratsflaschen verwendet, so daß die gesamte, etwa 10 min dauernde Waschung bei Zimmertemperatur stattfand.

c) *Das Übertragen der Eier in die Zuchtflaschen. Die Besiedlungsdichte.* Sofort nach der Waschung wurden die Eier auf dem nassen Sieb mittels eines Glasstäbchens zu Häufchen von je 120 Stück abgezählt, auf kleine Filtrierpapierstreifen (etwa 13 × 3 mm) hinüberschoben und darauf ausgebreitet. Diese Streifen wurden sodann in einer feuchten Kammer bei 25° aufbewahrt. Kurz vor dem errechneten Schlüpfbeginn der Larven erfolgte schließlich die Übertragung der „Eierpapierchen“ auf das Futter der Zuchtflaschen. Zu diesem Zeitpunkt bereits vereinzelt geschlüpfte Larven ließen auf verzögert abgelegte Eier schließen und wurden durch solche aus dem genau gleich behandelten Vorrat ersetzt. Damit waren die wirklichen Unterschiede im Eialter auf nur wenig mehr als die Dauer der Eiablage begrenzt.

Das genaue Abzählen der Eier (bei stets gleicher Futtermenge in den Zuchtflaschen) folgte u. a. dem Bestreben, überall gleiche Besiedlungsdichten zu erhalten. Dies gelang weitgehend, da sich unter den verschiedensten Versuchsbedingungen ähnliche Verpuppungsraten ergaben (s. Abb. 15, S. 299).

5. Zum rhythmischen Schlüpfen der Fliegen

Die Imagines von *Drosophila* haben im allgemeinen einen ausgeprägten, tageszeitlichen Schlüpfrrhythmus (s. z. B. KALMUS 1940). Dies hätte sich in unserer Untersuchung sehr störend auf die Bestimmung der Entwicklungszeiten ausgewirkt. Kontrollversuche mit unsern Tieren bestätigten das erwartete tages-

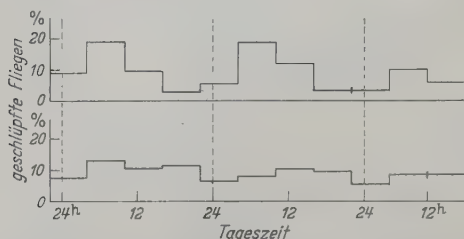


Abb. 3. Der tageszeitliche Schlüpfverlauf der Imagines bei natürlicher (oben) und bei dauernder künstlicher Belichtung (unten). Ordinate: je 6 Std geschlüpfte Tiere in Prozent der im abgebildeten Zeitbereich total Geschlüpften (je 4 Zuchten, oben mit total 885 und unten mit 661 Tieren)

rhythmische Verhalten und die hierfür zumindest wesentliche Rolle des täglichen Lichtwechsels.

In Abb. 3 ist der Schlüpfverlauf für einen Versuch dargestellt, dessen eine Hälfte dem normalen täglichen Lichtwechsel ausgesetzt war, währenddem die andere bei konstanter Belichtung gehalten wurde. Die Eiablagedauer betrug einen Tag, das Schlüpfen erstreckte sich über mehr als 4 Tage, wovon die drei Hauptschlüpfstage dargestellt sind. Aus

diesen Angaben ergibt sich, daß das rhythmische Schlüpfen keinesfalls durch den zwar ebenfalls tageszeitlichen Eiablage-Rhythmus verursacht sein kann. Die Abbildung zeigt deutlich, daß die Dauerbelichtung eine starke Dämpfung des tageszeitlichen Schlüpfrrhythmus bewirkt. Für alle hier zu besprechenden Versuche wurden deshalb die Thermostaten gegen grelles Tageslicht abgeschirmt und ununterbrochen gleichmäßig beleuchtet.

6. Diskussion der Zuchtmethodik

Schon zu Beginn der vorliegenden Untersuchung erwies sich die wichtige Forderung nach der Reproduzierbarkeit der Resultate, vor allem die Forderung, daß gleichbehandelte Zuchten auch gleiche Manifestationsbilder liefern sollen, als schwer erfüllbar. Eine gewisse Unvergleichbarkeit solcher Zuchten aus weitauseinanderliegenden Versuchen läßt sich allerdings aus Abänderungen des genetisch homogenen Ausgangsmaterials durch Mutationen erklären. Für die ebenfalls beobachteten Unterschiede zwischen Parallelzuchten ein und desselben Versuchs gilt dies hingegen nicht, da ein großes Eimaterial gleichmäßig aufgeteilt wurde. Eine geringe genetische Inhomogenität einer Elternpopulation, die wegen der Haltung des Stammes in Massenzuchten zwar möglich war, konnte sich höchstens streuungsvergrößernd auf die Manifestation auswirken. Die Fehlerquellen mußten demnach im Zuchtmilieu liegen.

Verhältnismäßig leicht gelang es, konstante Temperaturbedingungen zu schaffen und durch schonendes Einbringen der Eier in die Zuchtflaschen gleichmäßig hohe imaginale Schlüpfzeiten zu erhalten (NEF 1954) sowie durch Dauerbeleuchtung die tageszeitliche Schlüpfrrhythmik hinreichend zu dämpfen. Schließlich schien dank der oben beschriebenen Futterbereitung und Säuberung der Eier auch ein homogenes Verhalten gleichbehandelter Zuchten in der Defektausbildung

erreicht (NEF 1954); es handelte sich dabei nicht um sterile Zuchten, sondern um solche mit zwar starker Hemmung der von den einigermaßen sauberen Eiern ins ursprünglich sterile Futter eingeschleppten Mikroorganismen. Tatsächlich traten aber später wieder Zuchten mit deutlich aus der Reihe fallenden Defektbildern auf, was nur durch die Annahme ungleicher Entwicklung von Mikroorganismen in den einzelnen Parallelzuchten erklärbar ist. In weiteren, ähnlichen Untersuchungen wäre dringend nach einer Methode zu suchen, die bei völliger Unschädlichkeit für das Eimaterial eine hohe Ausbeute an wirklich sterilen Zuchten liefern würde. Dabei wäre aber darauf zu achten, daß sich damit nicht andere und gar schwerwiegendere Mängel in den Zuchtbedingungen (vgl. S. 306) einstellten.

B. Die untersuchten Entwicklungsgrößen und ihre Zusammenhänge

Die hier dargestellten Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf die Weibchen, mit Ausnahme des Abschnittes über die Entwicklungsraten, in dem die beiden Geschlechter zusammengefaßt betrachtet werden.

I. Die verwendeten Zuchtmilieus. Das Zahlenmaterial

In den folgenden Abschnitten werden die Entwicklungsdauer, die *Pl*-Manifestation, die Körpergröße der Imagines und die Entwicklungsraten unter verschiedenen Außenbedingungen betrachtet und zueinander in Beziehung zu setzen versucht.

Die experimentellen Milieuunterschiede wurden auf die Temperatur und den Hefe- und Vitamin-T-Gehalt des Futters beschränkt und für die einzelnen Zuchten während der ganzen Versuchsdauer unverändert gelassen. Nachstehend sind alle verwendeten Futtertypen und ihre Einfachheitshalber von nun an gebrauchten Symbole zusammengestellt:

Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Entwicklungsgrößen werden an nur zwei Hauptversuchen (I und II) abgeleitet. Für die Defektanalyse wurde ferner ein Versuch III (vgl. NEF 1954) beigezogen, der 20 gleichartige Zuchten umfaßt, nämlich solche bei 25° und mit Futter der Hefestufe A. Und endlich werden bei der Betrachtung der temperaturempfindlichen Phase für die Borstenbildung zwei ältere Versuche besprochen, die noch nicht unter den hier angegebenen normierten Zuchtbedingungen ausgeführt wurden.

Die Zuchten der Versuche I und II verteilen sich wie folgt auf die gewählten Temperaturstufen und die oben angegebenen Futtertypen:

Das Zuchtmilieu ist in folgenden stets durch die Angabe von Futtersymbol und Temperatur charakterisiert. Als Normalmilieu bezeichnen wir Vitamin T-freies Futter mit Hefeüberfluß bei 25° C (A-25), und als Mangelfutter solches mit weniger (B—D) oder ohne Hefe, da hier die Entwicklungsdauer verlängert und zugleich die Körpergröße herabgesetzt ist.

Die Auswahl der zu prüfenden Temperatur-Futter-Kombinationen folgte der Absicht, in erster Linie die Futterabhängigkeit der Entwicklungsmerkmale bei Normaltemperatur

Hefemenge in g für etwa 30 Flaschen (je 100 cm ³ Agar 2 %)	Menge Vitamin T in cm ³ je Zuchtflasche				
	0,2	0,02	0,002	0,0002	0
20	Aa	Ab	Ac	Ad	A
2	—	—	—	—	B
1	Ca	—	—	—	C
0,5	—	—	—	—	D
0	Oa	Ob	Oc	Od	O

Futter	Temperatur in ° C						Futter	Temperatur in ° C					
	22		25		28			22		25		28	
	I	II	I	II	I	II		I	II	I	II	I	II
Aa			2		3		C	3	3	3		3	
Ab			2				D			3			
Ac			2				Oa			2			
Ad			2				Ob			2			
A	3	3	3	3	3		Oc			2			
B			3				Od			2			
Ca					3		O			3			

(Versuch I) und die Temperaturabhängigkeit bei Normalfutter (Versuch II) zu untersuchen; die Größe der Versuche war beschränkt durch die im Einmann-Betrieb zu bewältigenden Verpuppungs- und Schlüpfkontrollen.

Das Zahlenmaterial stützt sich auf Einzelprotokolle von 2696 Tieren (s. Muster in Tabelle 1, S. 284), auf deren Wiedergabe wir aus Platzgründen verzichten müssen. Wir beschränken uns deshalb auf die Zusammenstellung der Mittelwerte und weiterer bedeutsamer statistischer Größen in Tabelle 2 (S. 288). Ebenso mußten einige Tabellen, vor allem jene, die die Grundzahlen zu den Korrelationsrechnungen enthalten, weggelassen werden. — Die erwähnten Protokolle und Tabellen sind im Zoologischen Institut der Universität Bern deponiert und können jederzeit eingesehen werden.

II. Die Entwicklungsdauer

(Vgl. Fußnote S. 273)

In sämtlichen Zuchten wurde in Abständen von wenigen — meist vier — Stunden das Schlüpfen der Imagines, sowie in den Flaschen 1 der Serien von Versuch II die

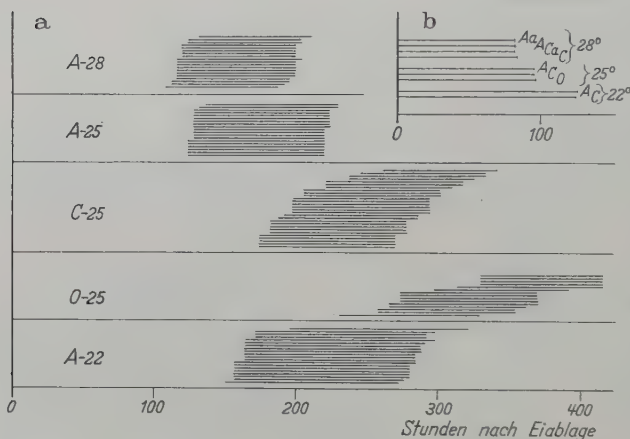


Abb. 4a u. b. Die Entwicklungsdauer der *Pl.* ♀♀ in verschiedenem Milieu. a Verpuppung und Schlüpfen (Zucht 1 einiger Serien von Versuch II). b Die mittlere Puppendauer (Zucht 1 sämtlicher Serien von Versuch II)

Verpuppung der Larven kontrolliert. Die frischgeschlüpften Fliegen wurden sofort entfernt und einige Stunden später fixiert. Die frisch verpuppten Tiere wurden einzeln in kleine Gläschen umgesiedelt; damit ließ sich hier neben der Embryonal- plus Larvendauer (im folgenden kurz als Larvendauer bezeichnet) für jedes Tier auch die Puppendauer ermitteln, da sowohl der Zeitpunkt seiner Verpuppung wie auch der des Schlüpfens bekannt war. Der Berechnung der Entwicklungsdauer wurden stets die Mitten der Eiablagen und der Verpuppungs- und Schlüpfintervalle zugrunde gelegt.

1. Larvendauer und Puppendauer. Ihre Abhängigkeit von Temperatur und Futter

Aus Abb. 4a geht deutlich hervor, daß die Larvendauer sowohl mit abnehmender Temperatur (vgl. A-28, A-25 und A-22) wie auch mit abnehmendem Hefegehalt des Futters (vgl. A-25, C-25 und O-25) zunimmt, währenddem die Puppendauer (Abb. 4b) bei abnehmender Temperatur ebenfalls verlängert wird, jedoch gänzlich futterunabhängig ist. Die Zugabe von Vitamin T beschleunigt — wie erwartet (GOETSCH 1953) — im allgemeinen die Larvenentwicklung (Abb. 5). Einzig im A-Futter bei 25° fällt diese Wirkung weg (s. Tabelle 2, S. 288); offenbar herrschen hier bereits ohne Vitamin T optimale Ernährungsverhältnisse. Ferner zeigt Abb. 4a, daß die Streuung der Larvendauer innerhalb der Zuchten mit dem Auftreten von Hefemangel erheblich zunimmt, die Streuung der Puppendauer dagegen konstant bleibt. Eine Korrelation zwischen Larven- und Puppendauer für die einzelnen Individuen ergab sich nicht. Die erstaunliche Konstanz der Puppendauer wird später (S. 306) noch diskutiert.

2. Vergleich der Entwicklungsdauer von *Pl/+* und *Cy/+*

Die weitere Betrachtung der Entwicklungsdauer bezieht sich auf die Gesamt-Entwicklungsdauer, da nur diese aus allen Zuchten direkt bekannt ist. Für die Darstellung ihrer Abhängigkeit vom Futter (Abb. 5) fehlte zunächst eine biologisch sinnvolle Futterskala: Die Hefekonzentration A ist, zumindest bei Normaltemperatur (25°), möglicherweise weit überoptimal, so daß sie nicht repräsentativ für eine bestimmte Entwicklungsdauer ist; ferner können die Vitamin-Serien nicht ohne weiteres in eine Hefeskala eingegliedert werden. Es wurden deshalb vorerst die Mittelwerte der Entwicklungsdauer in den 25°-Serien von Versuch I

so aufgezeichnet, daß die entsprechenden Punkte für *Pl/+* ♀♀ und *Cy/+* ♀♀ in der Ordinatenrichtung symmetrisch zu einer frei. gewählten Geraden liegen. Damit entsteht auf der Abszisse eine Futterskala. Die Serien von Versuch II wurden dann in dieses System eingetragen; für dabei neu auftretende Futtertypen

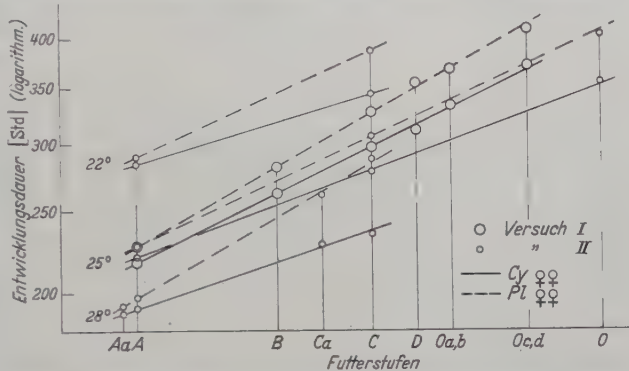


Abb. 5. Entwicklungsdauer und Milieu (Erläuterungen siehe im Text)

wurde wieder nach dem erläuterten Prinzip vorgegangen. Die ganze, so erhaltene Futterskala zeigt die erwartete Reihenfolge der einzelnen Serien: Je kleiner der Hefegehalt oder je kleiner der Vitamingehalt (bei entsprechenden Hefemengen), desto größer ist die Entwicklungsdauer. Wenn auch zwischen Entwicklungsdauer und Hefe- bzw. Vitamingehalt des Futters keine einfache Beziehung besteht, bieten sich auf diese Weise gute Vergleichsmöglichkeiten für den Verlauf der Entwicklungsdauer bei verschiedenen Temperaturen und für die beiden Genotypen.

Als wesentliche Ergebnisse lassen sich aus der beschriebenen Darstellung herauslesen:

1. Für 25° und 28° ergeben sich für die beiden Genotypen nur geringe und nicht systematische Abweichungen von den angepaßten Geraden. Dies bedeutet, daß die Entwicklungsdauer von *Pl/+* und *Cy/+* im Futtermittelversuch demselben Grundgesetz folgen.

2. Alle Geraden für *Pl* liegen höher als die zugehörigen für *Cy*, d. h. die *Pl* benötigen für alle Futtersorten und Temperaturen mehr Zeit für die Entwicklung als die gleich gehaltenen *Cy*.

3. Alle Geraden für *Pl* verlaufen steiler als die zugehörigen für *Cy*. Da die Entwicklungsdauer logarithmisch aufgetragen ist, heißt das, daß die *Pl*-Weibchen in ihrer Entwicklungsdauer stärker auf die Hefekonzentration ansprechen als die *Cy*. So ergibt sich beispielsweise für 25° in Versuch II ein Verhältnis der Entwicklungsdauer beider Genotypen von 1,03 für die Hefestufe A und ein solches von 1,14 bei Fehlen der Hefe (O).

4. Die verschiedenen Geraden für *Cy* in Versuch II sind einigermaßen parallel. Bei logarithmischer Auftragung der Entwicklungsdauer weist dies auf gleich große Zuwachsraten der Entwicklungsdauer bei entsprechender Herabsetzung des Hefegehaltes in den verschiedenen Temperaturen hin. Für *Pl* scheint dies dagegen nicht zuzutreffen; die Gerade für 28° ist auffällig steiler als jene für 25° und 22°, was bedeutet, daß die Futterabhängigkeit bei 28° stärker ist als in den niedrigeren Temperaturen.

(Der deutliche Unterschied zwischen Versuch I und II für 25° könnte auf genetischen Unterschieden beruhen, da die beiden Versuche mehr als ein halbes Jahr auseinanderliegen.)

Zusammenfassung. Die *Pl*-Tiere entwickeln sich langsamer und reagieren in ihrer Entwicklungsdauer empfindlicher auf Unterschiede im Hefe- und Vitamin T-Gehalt des Futters als die *Cy*-Tiere. Bei *Pl* ist eventuell zudem die Wirkung des Mangelfutters, im Gegensatz zu *Cy*, temperaturabhängig.

Da später (S. 302) an den Futterversuchen bei 25° die möglichen Beziehungen zwischen Entwicklungsgeschwindigkeit und Borstenwegfall ausführlich diskutiert werden, seien noch die *Streuungen* der Entwicklungsdauer in den betreffenden Serien dargestellt (Abb. 6). Für die *Pl*-Tiere war bereits in Abb. 5 die starke Zunahme der Larvendauer-Streuung mit zunehmendem Futtermangel ersichtlich. Dasselbe läßt sich auch hier für die Gesamtentwicklungsdauer erkennen, und zwar in gleicher Weise für *Pl* und *Cy*. Bei Hefeüberfluß fällt ferner die Konstanz der Streuung und die Übereinstimmung in beiden Genotypen auf. Die ebenfalls angegebenen Werte für Hefeüberfluß bei 22° zeigen, daß diese Übereinstimmung auch zwischen *Cy*-Tieren und praktisch defektfreien *Pl*-Tieren gilt.

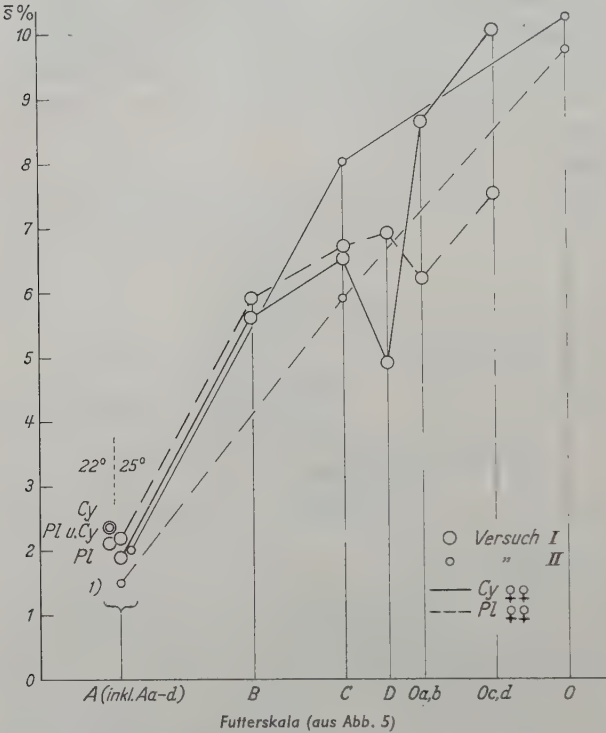


Abb. 6. Die mittlere relative Streuung (s %) der Entwicklungsdauer innerhalb der Zuchten in Abhängigkeit vom Futter bei 25° C

Der allgemeine Verlauf der relativen Streuung, d. h. ihr ganz beträchtlicher Anstieg mit zunehmender Entwicklungsdauer, kann dahin gedeutet werden, daß sich der Hefemangel zumindest für bestimmte Entwicklungsvorgänge ungünstig auswirkt, wodurch ihr normaler zeitlicher Ablauf bei den meisten Tieren mehr oder weniger gestört wird. Jedenfalls ist der Verlauf der relativen Streuung ein zweiter Hinweis darauf, daß die in Abb. 5 erhaltene Futterskala einem brauch-

baren Maßstab für die biologische Futtergüte entspricht (vgl. hierzu „Das Optimalmilieu“, S. 304).

III. Die *Pl*-Manifestation

Die Darstellung der Manifestation bezieht sich ausschließlich auf die Weibchen. Die Männchen zeigen übrigens dieselben *Pl*-Phäne, zudem ergaben hier nicht erörterte Versuche, daß unter den allgemein üblichen Zuchtbedingungen die Defektstärke in beiden Geschlechtern zumindest ähnlich ist. Ob jedoch die Manifestation in den beiden Geschlechtern auch quantitativ ähnlich von den Milieufaktoren abhängt, ist noch nicht untersucht und deshalb fraglich. So fand beispielsweise NOZAWA (1956), daß die *Curly (Cy)*-Expressivität der Männchen bedeutend temperatur- und futterempfindlicher ist als jene der Weibchen. — Eine eingehendere Betrachtung der temperaturempfindlichen Phasen der einzelnen Borstenloci folgt auf S. 307.

1. Die verschiedenen *Pl*-Phäne

Die allgemeine Beschreibung der *Pl*-Phäne auf S. 273 (vgl. dazu Abb. 7) sei hier durch einige Bemerkungen zur besonderen Art dieser Phäne ergänzt. Im Verlaufe dieser Betrachtung werden alle Mutantenmerkmale kürzehalber oft als *Pl*-Defekte bezeichnet. Hierzu ist immerhin anzumerken, daß es sich bei den auffälligeren Aderabnormitäten um durchaus normale, wenn auch zusätzliche Aderbildungen handelt, jedoch höchst selten um fehlende Aderstücke. Oft sind es neue Queradern, die überdies vor allem an wenigen bevorzugten Stellen auftreten. Liegen aber nur kleine Aderabzweigungen vor, dann häufig zwei gegeneinander hinlaufende, unter entsprechender Einbuchtung der beiden beteiligten Längsadern, so daß sich das kaum anders zu interpretierende Bild als das einer unvollständig entwickelten Querader bietet (Abb. 8e, S. 285). Für die Perlen ist bekannt (ROSEN 1951a), daß sie aus gesunden Zellkomplexen hervorgehen, die in der Imaginalscheibe durch absterbende Zellhaufen vom übrigen Blastem isoliert wurden. Über das Zustandekommen der übrigen Merkmale wissen wir bei unserer Mutante noch nichts.

Auffallend für die drei untersuchten Flügelphäne ist das Auftreten in bevorzugten Regionen. Die Perlen folgen vor allem den Längsadern III und IV, zusätzliche Aderbildungen treten fast ausschließlich in der distalen Flügelhälfte auf und die Randausschnitte endlich finden sich vorwiegend am aderlosen Hinter- rand des Flügels.

2. Aufnahme und Bewertung der *Pl*-Phäne

Es werden nur die fehlenden Borsten und die Flügelabnormitäten betrachtet und die Defektwerte beider Merkmale für jedes Tier ermittelt. Die Borstenanalyse beschränkt sich auf die dorsale Thoraxregion (Abb. 7) unter Weglassung der Humeralborsten, deren Bildung verhältnismäßig selten unterbleibt. Seltene Ausfälle wurden auch bei Kopfborsten beobachtet, die ebenfalls unberücksichtigt blieben. Damit erstreckt sich unsere Untersuchung auf das gesamte Gebiet des nach ZALOKAR (1947) von den Flügelimaginalscheiben gebildeten Exoskeletts, d. h. auf den dorsalen Mesothorax. Abnormitäten bezüglich Borstenort und -größe sowie Doppelborsten (aus getrennten oder nur aus einer Basalzelle hervorgehend) werden ebenfalls nicht ausgewertet, da sie auch bei den vergleichbaren Nicht-*Pl*-Tieren (*Cy/+*) auftreten.

Im Defektwert für den Flügel sind die Perlen, Randausschnitte und die deutlichen Aderverzweigungen und ganzen zusätzlichen Queradern berücksichtigt (Abb. 7). Kleinere Aderabnormitäten (Deltabildungen, Oesen und undeutliche Verzweigungen), die zum Teil wohl durch Perlen bedingt in deren unmittelbaren Nachbarschaft auftreten, blieben unbeachtet.

Aus der Tabelle 1 ist am Beispiel einer einzelnen Zucht ersichtlich, wie sämtliche *Pl*-Weibchen protokolliert wurden. Dabei folgte die Bewertung der Defekte im einzelnen den nachstehend aufgeführten Richtlinien:

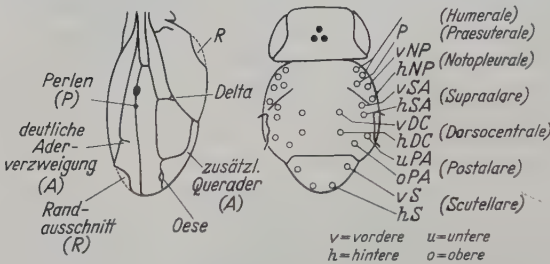


Abb. 7. Schema der Flügeldefekte und das dorso-thorakale Borstenmuster

- Borsten: Defekt = Anzahl der fehlenden Borsten
- Flügel:
 - zusätzliche Queradern und typische, auffallende Aderverzweigungen (A) je ein Punkt
 - Randausschnitte (R) in der Gesamtlänge bis zu $\frac{1}{4}$ des Flügelumfanges 1 Punkt
 - Perlen (P): je Fläche der „Einheitsperle“ (runde Perle, deren Durchmesser der Länge der

kleinen Querader entspricht) 1 Punkt, jedoch höchstens 6 Punkte für ein und dieselbe Perle

— Flügeldefekt = $A + R + P$, jedoch höchstens 12 je Flügel.

Tabelle 1. Die Aufnahme der Defekte (Protokoll-Muster, Zucht A-25₁ von Versuch II)

Verpuppungs- Intervall Schlüpf- Intervall	Tiere (Nr.)	Borsten										Flügel						Fehlende Borsten	Flügeldefekt	Thoraxlänge ^a (in Mebokular Einheiten)	
		= links — = rechts / Abkürzungen, s. Abb. 8																			
		P	NP		SA		PA		DC		S		links			rechts					
			v	h	v	h	u	o	v	h	v	h	A	R	P	A	R				P
k g	1					+									6			3	4	9	46 ¹ / ₂
	2			+		+		—		—					6			6	6	14	47
	3					+			—				2	1	2			2	4	7	47 ¹ / ₂
	4			+		+					+				2			6	6	8	47
	5			+		+				—					5			6	6	12	47
	6			+		+					—		1	1	6			5	4	14	47 ¹ / ₂
h	1			—						+	—				3			3	5	6	47
	2			—									1	1	3				5	6	47
	3			—				+			—		1	1	3			5	5	6	47
	4			—				+							5			2	2	7	49
l h	1			—		+		+			+				2			2	7	5	47
	2			—		+		+					1		5			1	4	7	48 ¹ / ₂
	3			—		+		+			—		1		2			2	6	5	47 ¹ / ₂
	4			—		+		+			—			1	10			6	5	17	47
	5			—		+		+							4	1	1	1	4	7	48 ¹ / ₂
	6			—		+		+						1	3		1	2	4	7	47 ¹ / ₂
m i	7			+		+		+		—			1	2	6	1		6	5	16	48
	1	+		+		+		+							2			3	7	5	47
	1	+		+		+		+							5			6	7	12	47
links		3	0	11	0	16	5	2	3	5	0	1	7	10	83						
rechts		5	0	12	0	15	3	3	1	8	1	0	3	6	68						
Total	19	8	0	23	0	31	8	5	4	13	1	1	10	16	151				94	177	902 ¹ / ₂

¹ Berechnung der Entwicklungsdauer s. S. 280.

² Vgl. S. 296.

Obschon eine Zusammenfassung der verschiedenen Flügelmerkmale in einen Gesamt-Flügeldefekt nicht ohne weiteres gerechtfertigt ist, wurde sie notwendig, weil in einzelnen Versuchsserien mit sehr stark defekten Flügeln eine Bewertung der Einzelphäne kaum möglich ist. Dies gilt für Flügel, die offenbar wegen sehr großer Perlen oder ausgedehnter Perlenfelder sich nicht normal ausbreiteten, sondern blasig und im distalen Teil oft unentfaltet blieben. Dadurch ist eine richtige Beurteilung des Flügelrandes und der Äderung unter Umständen verunmöglicht, währenddem die Angabe des Gesamtdefektes leichter fällt, da er meist sowieso den festgesetzten Höchstwert erreicht.

Die Angabe eines Gesamt-Flügeldefektes erfordert ein gegenseitiges Abstimmen der Bewertungsskalen für die drei Teildefekte. Dies wurde dadurch angestrebt, daß für ein genetisch homogenes Material (Einzelpaarzucht) mittlerer Defektstärke jene Bewertungsskalen ermittelt wurden, die die kleinste relative Streuung des Gesamtdefektes ergeben.

Die erläuterte Art der Aufnahme der Flügeldefekte sei gleich hier kritisiert. Sie eignet sich recht gut zur rechnerischen Bearbeitung des Materials; so erlaubt sie beispielsweise eine Betrachtung der Beziehungen zwischen an sich gänzlich verschiedenen Defektgruppen wie Borstenwegfall und Flügeldefekt. Für eine eigentliche Beschreibung des Mutantenflügels taugt sie jedoch wenig, vor allem deshalb, weil unsere Bewertung nichts über die Lage der Defekte im Flügel aussagt. In der folgenden Betrachtung der Manifestation unter verschiedenen Milieubedingungen werden deshalb der rein zahlenmäßigen Behandlung einige konkrete Flügelbilder und Darstellungen der Defektverteilung im Flügel vorangestellt.

3. Die Manifestation unter verschiedenen Milieubedingungen

a) Der *Pl*-Flügel. Die örtliche Verteilung der Defekte. Für den gesamten untersuchten Milieubereich schwankt die *Pl*-Manifestation im Flügel innerhalb

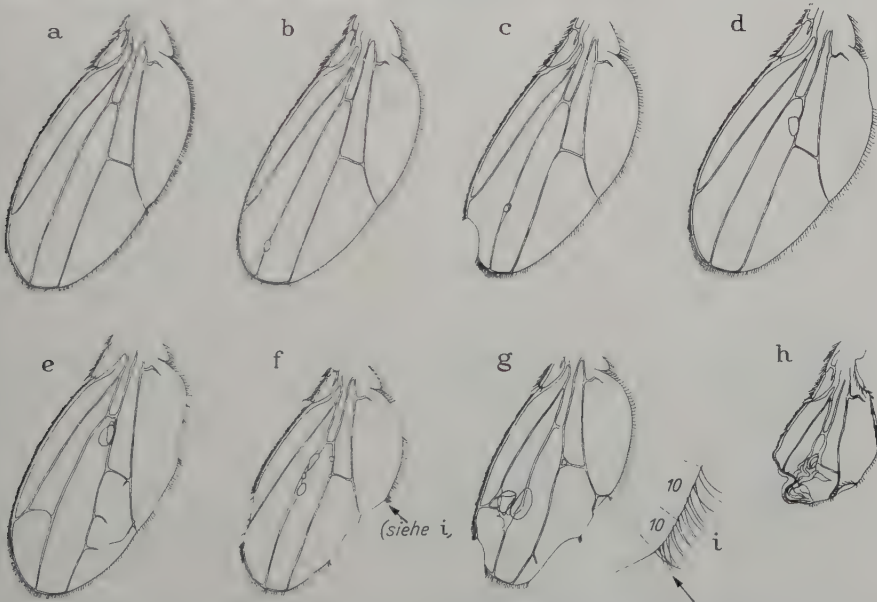


Abb. 8a—i. Flügelbilder von *Pl*-♀♀ aus verschiedenen Zuchttemperaturen (Hefegehalt A; Versuch II). 22° a ohne Defekt, b mit Defekt (kleine Perle) — selten; 25° c schwach defekt, d mittelstark defekt, e stark defekt; 28° f sehr schwach defekt, g stärker defekt, h stark defekt (Flügel nur teilweise ausgebreitet), i Randstück von f, zeigt die Verdichtung des Borstenbesatzes neben den Flügelkerben

sehr weiten Grenzen. Sie reicht vom normal aussehenden Flügel (A-22) bis zu mehr oder weniger unentfalteten Flügeln (in 28° häufig), die stets große Perlen

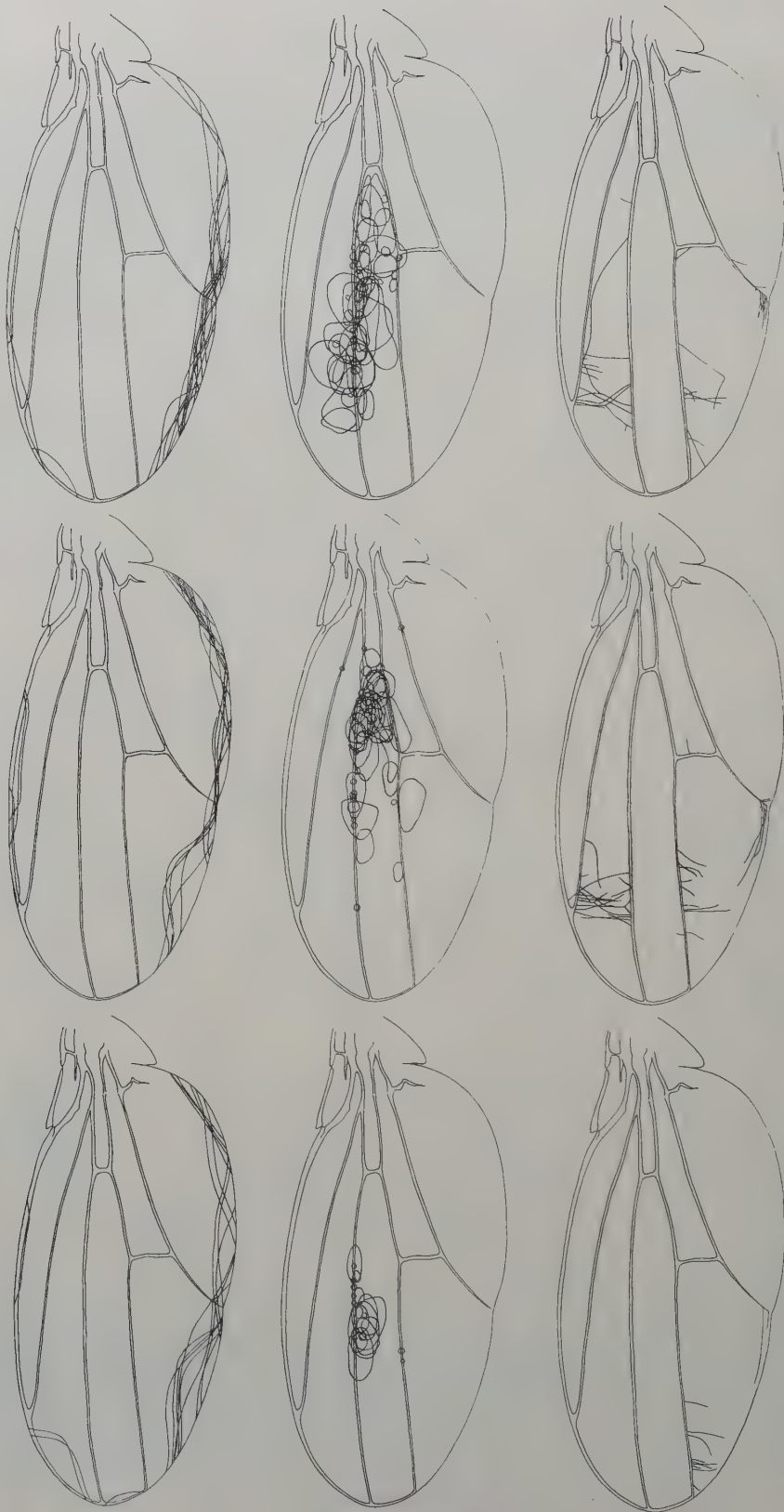


Abb. 9. (Erläuterungen s. S. 287)

und zahlreiche Aderabnormitäten erkennen lassen. Da der Manifestationsgrad auch innerhalb der Zuchten beträchtlich variiert, ergibt das Gesamtmaterial eine kontinuierliche Reihe vom normalen bis zu sehr stark defekten Flügeln, wobei sich die milieubedingten Serien oft stark überlappen. In Abb. 8 sind einige Flügel von Tieren wiedergegeben, die sich in verschiedenen Temperaturen entwickelten. Es wurde versucht, für die betreffenden Temperastufen typische Flügel, zugleich aber möglichst viele der beobachteten Varianten eines Defekttyps (vor allem der Randdefekte) abzubilden. Die Ausschnitte des Flügelrandes und Eigenheiten seines Borstensaumes werden später (Abschnitt C. III., S. 312) eingehender behandelt.

Bei der Durchsicht einer beliebigen Serie von Tieren fällt auf, daß die Randdefekte, die Perlen und die Aderabnormitäten an bestimmten Flügelorten gehäuft auftreten, an andern aber selten oder überhaupt nicht. Die defektreichsten Orte können zudem mit dem Milieu wechseln. Dies geht sehr deutlich hervor aus Abb. 9, in der die Defekte einer größeren Anzahl von Tieren desselben Zuchtmilieus in einem Flügelumriß aufeinandergezeichnet sind.

In Abb. 9 wurden nur jene Flügel verwertet, die eine sichere Aufnahme der Defekte zuließen; in der Serie A-28 fiel deshalb vor allem die große Zahl stark defekter Flügel weg, die ungenügend ausgebreitet sind. Immerhin wurde festgestellt, daß gerade diese letzteren in den bevorzugten Defektorten eher noch stärker von den 25°-Tieren abweichen als die verhältnismäßig schwach defekten. Die Verschiedenheit der Verteilungsbilder für 25 und 28° beruht somit keinesfalls auf der erwähnten Auslese. Da die Aufnahme der Verteilungsmuster zudem lange Zeit nach Abschluß der Versuche erfolgte, fielen ferner in allen Serien einige Tiere in der Folge von Konservierungsmängeln aus; systematische Fehler ergeben sich daraus keine.

Mittels der in Abb. 9 dargestellten Serien läßt sich hinreichend belegen, daß die örtliche Defektverteilung sowohl von der Temperatur wie auch vom Hefegehalt des Futters beeinflusst wird. Und zwar liegen bei hoher Temperatur oder bei Hefemangel die Randausschnitte und die Perlen distaler als bei Normalbedingungen.

b) *Die Penetranz.* Unter den betrachteten Versuchsbedingungen zeigen weitaus die meisten Tiere Defekte, d. h. das *Pl*-Gen ist hier beinahe vollkommen penetrant. Bei gesonderter Betrachtung der beiden hauptsächlichen Regionen der *Pl*-Manifestation, des Thorax und des Flügels, ergibt sich folgendes: Während dem die Penetranz bezüglich der Thorax-Beborstung durchgehend sehr hoch ist (94–100%), gilt dies in bezug auf den Flügel nur für die beiden höheren Temperaturstufen. Bei 22° ist die Penetranz bereits sehr niedrig, wobei sie allerdings stark vom Hefegehalt des Futters abhängt. Und zwar liegt sie beim einzigen hier verwendeten Mangelfutter auffälligerweise wesentlich höher als beim Normalfutter.

c) *Die Borsten- und Flügel-Expressivität.* Unter Expressivität soll hier der mittlere Manifestationsgrad der Tiere einer einzelnen Zucht oder einer Gruppe von Zuchten verstanden werden, d. h. die Summe der Defekte dividiert durch

Abb. 9. Das Verteilungsmuster der Flügelmerkmale bei verschiedenem Zuchtmilieu (Summierung der Defekte einer Gruppe gleichbehandelter Tiere in derselben Zeichnung, Versuch II).

Links: Randausschnitte	oben: 28°, viel Hefe (A-28; 21 Flügel)
Mitte: Perlen	Mitte: 25°, viel Hefe (A-25; 40 Flügel)
rechts: zusätzliche Adern	unten: 25°, ohne Hefe (O-25; 23 Flügel)

Borstenfreie Randstücke ohne eigentliche Kerbe unberücksichtigt; zusätzliche Adern schematisch, unter Weglassung der Längsaderdeformierungen. — Weitere Erläuterungen im Text

Tabelle 2. *Entwicklungsdauer, Defekte und Körpergröße in den Serien der Versuche I und II (Mittelwerte $\bar{x}$ und relative mittlere Streuungen $\bar{s}/\bar{x}$ der Einzeltiere innerhalb der Zuchten) mit Angabe der P-Werte für die Differenz der Mittel aufeinanderfolgender Futterstufen*

Serie	Anzahl Tiere	Entwicklungsdauer (Stunden)				P ₁ -Expressivität				Körpergröße				
		totale		pupale		larvale		Borsten		Flügel		Thoraxlänge (48,5 = 1 mm)		Vo- lumen
		$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	$\bar{x}$	$\frac{\bar{s}}{\bar{x}} \%$	
Versuch I														
Aa,b-25	101	227,8 ± 0,5	2,2			132,4		4,5 ± 0,1	30	6,6 ± 0,5	70	0,99		
Ac,d-25	92	228,0 ± 0,6	2,3			132,6		4,8 ± 0,2	34	6,4 ± 0,4	61	1,01		
A-25	83	227,0 ± 0,5	2,1			131,6		4,8 ± 0,1	27	7,9 ± 0,5	54	1,00		
B-25	78	281,9 ± 1,9	5,9			186,5		4,3 ± 0,2	42	9,2 ± 0,5	48	0,88		
C-25	63	326,7 ± 3,2	6,7			231,3		4,4 ± 0,2	39	7,6 ± 0,6	60	0,73		
D-25	66	351,5 ± 3,2	6,9			256,1		3,3 ± 0,2	44	5,4 ± 0,5	80	0,64		
Oa,b-25	107	368,5 ± 2,8	6,2			273,1		2,9 ± 0,2	57	3,8 ± 0,4	135*	0,56		
Oc,d-25	106	412,5 ± 3,7	7,5			317,1		2,6 ± 0,1	57	2,9 ± 0,3	89	0,46		
A-22	79	283,1 ± 0,7	2,1			158,5		2,2 ± 0,1	54	0,0		1,02		
Versuch II														
Aa-28	57/22**	193,2 ± 0,7	2,3	81,5 ± 0,6	3,6	111,3 ± 0,8		4,3 ± 0,2	43	20,1 ± 0,6	21	0,87		
A-28	53 19	197,7 ± 0,9	2,5	81,9 ± 0,6	3,0	115,8 ± 0,8		4,0 ± 0,3	50	21,5 ± 0,4	15	0,86		
Ca-28	45 14	261,7 ± 3,9	7,8	81,6 ± 1,5	6,7	179,8 ± 4,0		5,4 ± 0,3	34	17,7 ± 0,8	31	0,77		
C-28	53 15	289,4 ± 3,5	8,9	82,7 ± 0,8	3,6	207,5 ± 3,6		4,5 ± 0,3	44	14,7 ± 0,9	45	0,72		
28 ⁰	70			81,9 ± 0,4	4,2									
A-25	76 19	226,6 ± 0,4	1,5	95,2 ± 0,4	1,9	131,2 ± 0,7		4,4 ± 0,2	38	9,9 ± 0,5	43	0,96		
C-25	72 28	307,0 ± 2,4	5,9	95,0 ± 0,6	3,1	211,6 ± 2,5		3,8 ± 0,2	50	9,1 ± 0,6	60	0,70		
O-25	60 15	406,4 ± 5,3	9,7	96,3 ± 1,8	7,1	311,0 ± 5,3		3,0 ± 0,2	45	6,8 ± 0,8	87	0,53		
25 ⁰	62			95,4 ± 0,5	4,2									
A-22	71 20	290,2 ± 0,8	2,3	125,0 ± 0,8	3,0	165,6 ± 1,1		2,4 ± 0,1	52	0,1	—	1,01		
C-22	74 24	388,0 ± 3,3	7,2	124,3 ± 1,0	4,0	263,4 ± 3,4		3,4 ± 0,2	42	0,7 ± 0,1	175*	0,76		
22 ⁰	44			124,6 ± 0,7	3,5									

P-Werte: ■ = < 0,001; □ = 0,001—0,01; — = 0,01—0,05; = > 0,05.

* Siehe Erläuterungen, Allgemeines.

** Siehe Erläuterungen zu den einzelnen Kolonnen.

die Gesamtzahl der Tiere, worin also jene ohne sichtbare *Pl*-Manifestation inbegriffen sind. Damit entspricht hier Expressivität sinngemäß dem, was von BEZEM und SOBELS (1953) „Degree of abnormality“ genannt wurde.

Eine Zusammenstellung aller errechneten Mittelwerte für die einzelnen Versuchsserien ist in Tabelle 2 gegeben. In den Abb. 10—12 werden die verschiedenen Temperatur-Futter-Kombinationen stets durch die Mittelwerte ihrer Gesamt-Entwicklungsdauer dargestellt. Diese ist innerhalb der einzelnen Futterreihen zugleich repräsentativ für die Larvendauer, da Hefe- und Vitamin T-Gehalt die Puppendauer nicht beeinflussen. Beim Vergleich entsprechender Serien der Versuche I und II ist einige Vorsicht geboten; wie Abb. 10 vermuten läßt, unterscheiden sich die Serien C-25 gesichert in ihrer Entwicklungsdauer, ebenso, wenn auch weniger auffällig, die Serien A-22. Dies ließ bereits früher (S. 282) eine genetische Differenz zwischen den Populationen der beiden Versuche vermuten. Daneben sind auch geringe aber wirksame Milieudifferenzen, etwa in Form terramycin-unempfindlicher Bakterien, nicht ausgeschlossen.

Erläuterungen zu Tabelle 2

Allgemeines zur zahlenmäßigen Kennzeichnung der Entwicklungsmerkmale:

Die Mittelwerte und deren mittlere Fehler wurden aus der Gesamtheit der Tiere der betreffenden Serie berechnet, und zwar auch dann, wenn sich diese in bezug auf ihre einzelnen Zuchten in einem oder mehreren Merkmalen als heterogen erwies. Die Mittelwerte können deshalb mit einem größeren mittleren Fehler behaftet sein, als aus der angegebenen mittleren Streuung der Einzeltiere zu erwarten wäre. Die Höhe des mittleren Fehlers setzt sich somit in stark wechselndem Maße aus der (biologischen) Streuung der Tiere und der experimentellen Streuung der Zuchten (d. h. der Versuchsbedingungen) zusammen. Ihre Angabe dient lediglich der Beurteilung, ob zwei Serien in ihren Mittelwerten wesentlich voneinander abweichen.

Die relativen mittleren Streuungen der Einzeltiere innerhalb der Parallelzuchten beziehen sich auf die Serienmittel. Sie können rein rechnerisch 100% übersteigen, da die Asymmetrie der Streuung unberücksichtigt blieb. Mittelwert und relative mittlere Streuung dienen zusammen der biologischen Kennzeichnung der Serie. — Der Vergleich der Streuung des Gesamtmaterials einer Serie (aus dem Fehler des Mittels leicht errechenbar) mit der mittleren Streuung aus den Einzelzuchten liefert ein Urteil über die Homogenität der betreffenden Serie. (Zur Homogenität der Serien s. auch S. 291.)

Die gebrauchten statistischen Meßzahlen und Prüfformeln sind im Statistischen Anhang zusammengestellt.

Erläuterungen zu den einzelnen Kolonnen:

Serie: Sie hat drei Zuchten, mit Ausnahme der Vitaminserien von Versuch I mit deren nur je zwei, die deshalb zu Gruppen von zwei aufeinanderfolgenden Vitaminstufen zusammengefaßt wurden.

Anzahl Tiere: Die rechtsstehenden Angaben in Versuch II bedeuten die Zahl der Tiere, für die die Verpuppung beobachtet wurde (vgl. nächste Bemerkung).

Pupale Entwicklungsdauer = Pupariumbildung bis Schlüpfen der Fliegen: Sie wurde nur in einer Zucht je Serie und nur in Versuch II aufgenommen. Da sie offensichtlich futterunabhängig ist, sind zudem die Gesamtmittel für die verschiedenen Versuchstemperaturen angegeben.

Larvale Entwicklungsdauer: Da sie, wie die pupale, direkt nur für eine Zucht jeder Serie von Versuch II bekannt ist, wurde sie in beiden Versuchen mit Hilfe der besten Schätzung der Puppendauer berechnet, d. h. mit deren Mittelwerten für die entsprechenden Temperaturen.

Volumen (s. auch S. 297): Es ist proportional dem Kubus der Thoraxlänge, wobei diese für die Serie A-25 des Versuches I gleich eins gesetzt ist.

Die graphische Darstellung der Flügel- und Borsten-Expressivität für sämtliche verwendeten Milieutypen (Abb. 10) liefert ein sehr uneinheitlich wirkendes Bild.

Wohl ergibt sich als Gesamteindruck eine Verminderung der Defekte mit abnehmendem Hefegehalt des Futters und damit zunehmender Entwicklungsdauer. Sicher ist zudem eine starke Beeinflussung der Defektbildung im Flügel durch die Versuchstemperatur (vgl. Abb. 8, S. 285). Daneben ist aber in bestimmten Milieubereichen ein gesicherter Anstieg der Defekte bei Verringerung des Hefegehaltes

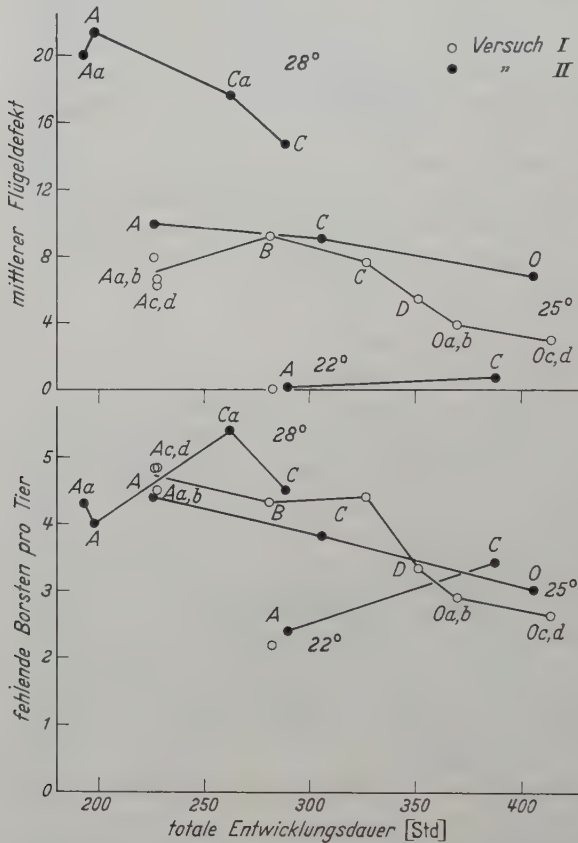


Abb. 10. Mittlerer Borsten- und Flügeldefekt in den Serien der Versuche I und II

sichtbar. Dies gilt für den Flügel bei 25° (Versuch I, Hefestufen A bis B) und die Borsten bei 28 und 22° (für den letzteren Fall ist zu vermuten, daß bei noch stärkerem Hefemangel die Defekte wieder abnehmen, analog den beiden anderen Fällen).

Werden die drei *Pl*-Merkmale des Flügels getrennt betrachtet (Abb. 11), so zeigen Perlen und Aderabnormitäten qualitativ ähnliche Abhängigkeiten vom Hefegehalt (jedenfalls bei 25°), währenddem der Randdefektwert eher futterunabhängig ist. Verschiedene Merkmale können sich also in einem bestimmten Milieubereich wesentlich verschieden verhalten. Das gilt auch für die einzelnen Borstenloci (Abb. 12). Der Wegfall der hinteren Supraalaren (*hSA*) sinkt bei 25° mit zunehmendem Hefemangel sehr deutlich, die hintere Noto-

pleurale (*hNP*) dagegen scheint hefeunempfindlich. Verfolgt man die Ausfallhäufigkeiten einzelner Loci im Temperaturversuch bei Normal- und bei Mangelfutter, so fällt auf, daß sie unter sich sehr verschieden und zudem zum Teil gänzlich anders als im entsprechenden Entwicklungsdauerbereich des Futterversuchs verlaufen.

Zur Frage eines kausalen Zusammenhanges zwischen Entwicklungsdauer und Manifestation kann vorläufig folgendes gesagt werden:

1. Verschiedene Temperatur-Futter-Kombinationen mit jedoch sehr ähnlicher Entwicklungsdauer (C-28 und A-22!) ergeben außerordentlich verschiedene Flügel- und Borsten-Expressivitäten.
2. Der Defektverlauf eines Merkmals innerhalb eines bestimmten Entwicklungsdauer-Bereiches kann sehr verschieden sein, je nachdem ob das Futter oder die Temperatur variiert wurde.

Aus diesen Tatsachen folgt, daß Temperatur und Futter die Defektbildung verschiedenartig beeinflussen und sich deshalb der resultierende Effekt nicht durch die Entwicklungsdauer kennzeichnen läßt. Dies schließt aber keineswegs aus, daß auch eine direkte Wirkung der Entwicklungsgeschwindigkeit auf die Manifestation besteht (vgl. hierzu Abschnitt C. II. 2., S. 309).

4. Zur Homogenität der Versuchsserien

(Über die Homogenität innerhalb der Einzelzuchten s. S. 294)

Es ist bereits festgestellt worden (S. 289), daß milieumäßig sich entsprechende Serien der beiden Hauptversuche zum Teil sicher verschiedene Entwicklungsdauer ergaben. Dasselbe gilt übrigens auch für andere Entwicklungsmerkmale (vgl. in Tabelle 2 die Serien A-25, C-25 und A-22). Es wurde vermutet, daß daran unter anderem geringe Futterunterschiede schuld gewesen seien, verursacht durch unterschiedliche Infektionen in den beiden zeitlich weit auseinanderliegenden Versuchen. Zudem besteht natürlich die Möglichkeit, wenn wohl auch in geringerem Ausmaß, daß durch Infektionen Futterunterschiede zwischen gleichbehandelten Zuchten ein und desselben Versuchs entstehen. Der Versuch III, der sich aus 20 solcher Parallelzuchten zusammensetzt, wurde deshalb auf Homogenität geprüft. Die Prüfung mußte sich auf die Expressivität beschränken, weil die Entwicklungsdauer in zu großen Intervallen und die Körpergröße überhaupt nicht aufgenommen worden war.

Wie bereits früher mitgeteilt (NEF 1954), zeigte die Streuungszerlegung, daß der Versuch in bezug auf die Gesamtflügeldefekte als homogen gelten darf ($P > 0,05$). Dasselbe gilt auch für die Anzahl der fehlenden Borsten. Die Frage nach der Einheitlichkeit des Materials ist aber damit nicht klar bejaht. Im Verlauf der Bewertung der Flügeldefekte in den verschiedenen Versuchen verstärkte sich nämlich der Eindruck, daß einzelne Zuchten ganz „persönliche“, vom Üblichen für das betreffende Milieu abweichende Defektbilder aufweisen, zur gefühlsmäßigen Gewißheit. Doch gingen diese feinen Unterschiede bei der geübten groben Protokollierungsart der Flügeldefekte (summarische Defektwerte für die einzelnen Merkmale ohne nähere Angaben) für die Auswertung zwangsläufig fast gänzlich verloren.

Damit soll keineswegs gesagt werden, daß solche komplexen Eigenheiten des Defektbildes oder ganz allgemein der Gestalt eines Organismus nicht wissenschaftlich faßbar seien. Es

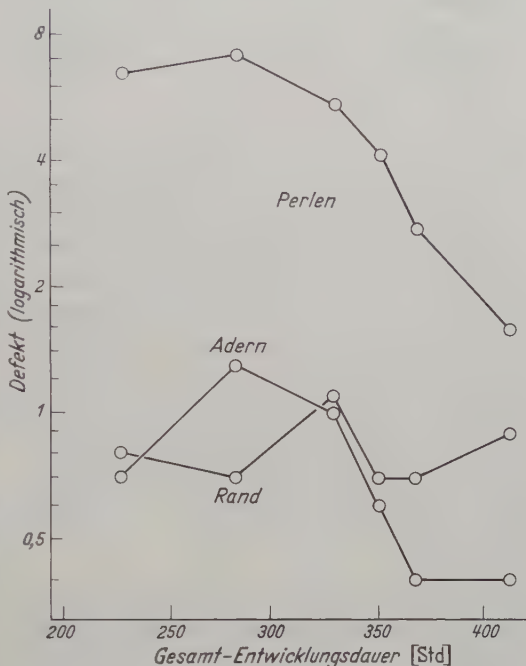


Abb. 11. Die mittleren Flügeldefekte in den 25°-Serien des Versuches I

wäre sogar äußerst reizvoll, in dieser Richtung vorzudringen. Hingegen ist zu bedenken, daß die Analyse von Komplexqualitäten, die das Auge unter Umständen noch leicht schaut und unterscheidet, einen außerordentlichen methodischen Aufwand erfordern kann und möglicherweise mathematisch schwierige Probleme stellt.

Im Hinblick auf die weitere Auswertung unseres Materials sei folgendes betont: Praktisch ist es stets möglich, daß scheinbar gleich behandelte Zuchten im

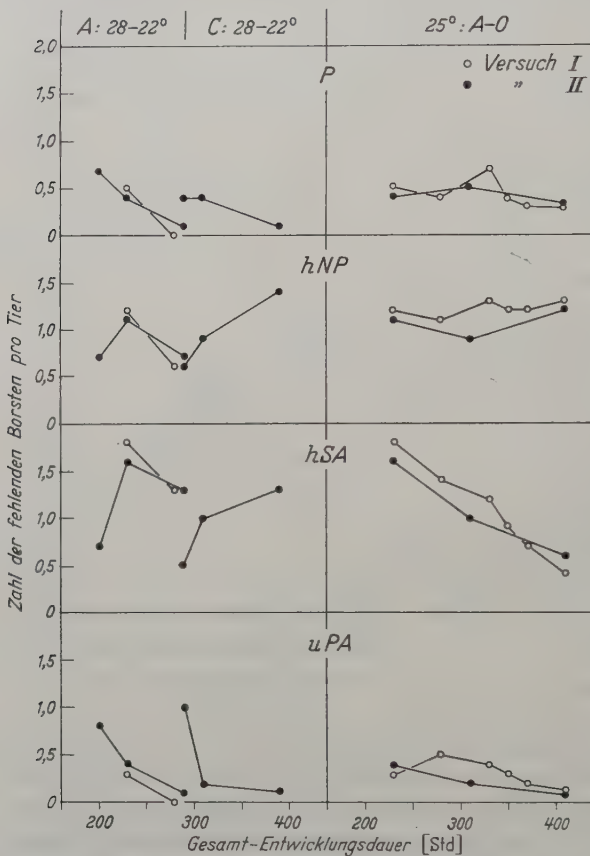


Abb. 12. Der Wegfall verschiedener Borsten im Temperaturversuch (links) und im Futtermittelversuch (rechts)

einem oder anderen Merkmal geringe, aber doch sichere Unterschiede aufweisen. Es ist deshalb unbedingt notwendig, bei der Analyse von Korrelationen zwischen den verschiedenen Merkmalen die einzelnen Parallelzuchten einer Serie gesondert zu behandeln; denn ihre Zusammenfassung zu einem einzigen Material, das möglicherweise inhomogen ist, kann — wie später noch gezeigt wird (S. 293) — zu Scheinkorrelationen führen.

5. Korrelationen im Defektmuster

Hier läßt sich grundsätzlich nach zwei Typen von Korrelationen fragen: Erstens einmal nach Korrelationen zwischen Defektgruppen (Borstenumuster und Flügel) oder zwischen einzelnen Merkmalen (z. B. Aderdefekten und Perlen), und ferner nach einer Korrelation zwischen links- und rechtsseitigen Defekten des Tieres. Beide Fragen werden im folgenden behandelt.

a) Links-rechts-Korrelationen im Borstenwegfall. In Versuch III, der als weitgehend homogen gelten darf, wurden alle Borstenloci, die nicht allzu spärlichen Ausfall zeigten (P, hNP, hSA, uPA, oPA, vDC, hDC) auf ihre links-rechts-Verteilung geprüft: Die Zahl der Tiere mit beidseitigem, nur linksseitigem, nur rechtsseitigem und überhaupt keinem Ausfall im betreffenden Locus wurden mit den zufällig zu erwartenden Anzahlen (d. h. den theoretischen eines unkorrelierten Materials) verglichen. Es gibt dies eine normale Vierfeldertafel. Dabei ließ lediglich ein einziger Locus (die uPA) eine positive *l-r*-Korrelation vermuten.

Ferner zeigte nur ein einziger Locus (die hDC) eine sehr geringe, gänzlich ungesicherte negative Korrelation. Diese beiden Extremfälle werden nun weiterverfolgt. Im bereits betrachteten Versuch wie auch in den beiden anderen wird die Abweichung von der unkorrelierten *l-r*-Verteilung mittels einer angepaßteren Methode (s. Statistischer Anhang) genau geprüft. Sie erlaubt eine gesamthafte Betrachtung eines Materials aus verschiedenen Anteilen mit sehr unterschiedlichen Ausfallhäufigkeiten, wie es in den Versuchen I und II vorliegt. Selbstverständlich wird damit auch bedeutungslos, ob die Serien homogen sind oder nicht.

Tabelle 3. Die links-rechts-Korrelationen der uPA und der hDC in den Versuchen I und II

Versuch	uPA				hDC			
	Anzahl Zuchten	Anzahl Tiere	P	Korrelations-Koeffizient <i>r</i>	Anzahl Zuchten	Anzahl Tiere	P	Korrelations-Koeffizient <i>r</i>
I Aa—B C—Od	28* 14 14	696	0,075	+0,07 (+0,10) +0,06 +0,08	31	775	0,45	—0,027
II	21*	416	0,024	+0,11 (+0,82)	27	561	0,45	+0,032
III	20	450	0,042	+0,10 (+0,09)	20	450	0,23	—0,057
Total	69	1562	0,0005	+0,088	78	1786	0,42	—0,019

* Hier sind die 22⁰-Serien weggelassen, da sie keinen nennenswerten Ausfall zeigen. Erläuterungen zu den eingeklammerten, „falschen“ *r*-Werten, siehe Text!

Die erhaltenen *P*-Werte und die Korrelationskoeffizienten sind aus Tabelle 3 ersichtlich. Die uPA zeigt eine gesicherte positive Korrelation der Seiten. Für eine wirkliche negative Seitenkorrelation der hDC besteht hingegen kein Verdacht. Der Vergleich der *l-r*-Korrelationskoeffizienten beider Loci ergibt eine gesicherte Differenz ($P < 0,05$). Bei der Berechnung dieses Wertes ist berücksichtigt, daß von den betrachteten sieben Loci diejenigen mit den extremen Korrelationskoeffizienten verglichen werden (s. Statistischer Anhang, Range-Test). Die rein rechnerisch festgestellte Tatsache einer positiven Korrelation von links- und rechtsseitigem Ausfall in einem bestimmten Borstenlocus verlangt eine biologische Deutung.

Grundsätzlich bestehen für das Zustandekommen einer positiven, statistisch gesicherten Korrelation 3 Möglichkeiten:

1. Zwischen den beiden korrelierten Merkmalen bestehen direkte Beziehungen, d. h. es handelt sich um eine echte Korrelation. Für unseren Fall würde dies bedeuten, daß sich die beiden dorso-mesothorakalen Anlagen in der Defektbildung gegenseitig beeinflussen.

2. Die beiden korrelierten Merkmale werden durch eine dritte variierende Größe gleichsinnig beeinflusst. So wird z. B. die Ausfallhäufigkeit einer bestimmten Borste mit der Temperatur verändert — und zwar eben links und rechts gleichartig. Dadurch — s. unten! — erhalten wir eine Scheinkorrelation.

3. Als Spezialfall von 2. kann in einem einheitlich behandelten Material eine trotzdem vorhandene Inhomogenität (z. B. in irgendeinem nicht kontrollierbaren

Milieufaktor) ebenfalls zu einer positiven Scheinkorrelation der beiden betrachteten Merkmale führen.

Eine echte Seitenkorrelation ist für die uPA nicht anzunehmen. Da sich die hDC wesentlich anders verhält, müßte ja eine — sehr unwahrscheinliche — locus-spezifische Wechselwirkung zwischen den beidseitigen Anlagen angenommen werden. Der 2. Fall ist durch die eingeklammerten r -Werte für die uPA in Tabelle 3 illustriert. Sie ergaben sich daraus, daß sie Gesamtheit der Tiere jedes der 3 Versuche als einheitliches Material betrachtet wurde. In Versuch III mit ausschließlich gleichbehandelten Zuchten, ergibt sich kaum eine Abweichung vom richtigen Korrelationskoeffizienten. Ähnlich verhält es sich in Versuch I mit verschiedenen Hefestufen bei derselben Temperatur, da die Ausfallhäufigkeit der uPA höchstens eine geringe Futterabhängigkeit hat (s. Abb. 12). In Versuch II hingegen täuscht das Vorhandensein dreier Zuchttemperaturen, die sehr verschiedene Ausfallhäufigkeiten zur Folge haben, eine außerordentlich starke Seitenkorrelation vor. Da diese Fehlerquelle, wie bereits erwähnt, in unserer Auswertung ausgeschaltet wurde, drängt sich die Vermutung auf, daß die erhaltene l - r -Korrelation für die uPA auf einer *Inhomogenität innerhalb* der einzelnen Zuchten beruht. Als dafür verantwortlicher Faktor ist die Temperatur auszuschließen, nicht aber das Futter. Doch fällt ferner auf, daß die Korrelation in Versuch III, wo nur Normalfutter vorkommt, ungefähr gleich stark ist wie in I und II, die auch Mangelzuchten enthalten. Noch bedeutsamer ist, daß in Versuch I sich sehr ähnliche Korrelationskoeffizienten ergeben für die Gruppen „Hefeüberfluß bis schwacher Hefemangel“ (Aa—B) und „mäßiger bis gänzlicher Hefemangel“ (C—Od), in welcher letzterer wohl mit größerer Futter-Heterogenität zu rechnen war. So kommt als Ursache einer Scheinkorrelation kaum das Futter, sondern am ehesten eine *genetische* Inhomogenität in Frage. Sie wäre in nicht bei allen Tieren gleichmäßig vorhandenen Modifikationsgenen zu suchen; d. h., das Material würde sich aus Individuen mit schwächerer und solchen mit stärkerer Tendenz zum Wegfall der uPA zusammensetzen. Eine derartige Inhomogenität muß bei der Art und Weise, wie der *Pl*-Stamm gehalten wurde (s. S. 275), als möglich gelten.

b) *Korrelationen zwischen einzelnen Borstenloci.* Die Suche nach allfälligen Korrelationen zwischen verschiedenen Loci blieb auf die in Abb. 13 bezeichneten Borstenpaare beschränkt. Das angewandte rechnerische Verfahren ist dasselbe wie für die soeben erörterte links-rechts-Untersuchung (s. Statistischer Anhang). Die Auswertung mittels Vierfeldtafeln gelingt auch hier, indem die beiden Seiten des Tieres einzeln, also unabhängig voneinander, betrachtet werden. Dies ist erlaubt, weil durchwegs höchstens geringe links-rechts-Korrelationen bestehen (s. letzten Abschnitt).

Vorerst fällt in Abb. 13 die eindeutig positive Korrelation zwischen den beiden Dorsozentralborsten auf. Unter Berücksichtigung der Schwellenwerte r^* für Versuch III, erwecken die Korrelationskoeffizienten der übrigen Borstenpaare den Eindruck einer zufälligen, etwas in den positiven Bereich verschobenen Verteilung um Null. Diese zeigt auch keinerlei verdächtigen Zusammenhang mit dem Borstenmuster. Eine allfällig tatsächliche Verschiebung rein zufälliger Werte in den positiven Bereich wäre als Folge einer geringen Inhomogenität innerhalb der Zuchten (siehe oben) zu deuten. Andererseits ist aber nicht aus-

geschlossen, daß zumindest für einzelne dieser Borstenpaare wirkliche, wenn auch schwache Korrelationen bestehen. So ergibt die Korrelation zwischen den Scutellaren immerhin ein P von 0,037; da es sich aber um einen aus mehreren Fällen ausgelesenen Extremwert handelt (s. Tabelle 4), darf diese Korrelation

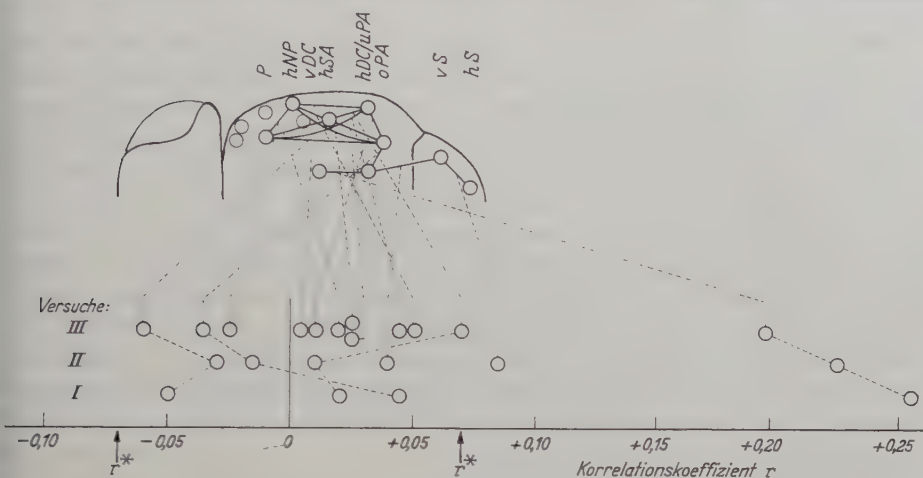


Abb. 13. Die Korrelation des Borstenwegfalls zwischen verschiedenen Loci. r^* ungefähre 5 %-Grenze für die Abweichung von $r = 0$ für die Werte von Versuch III

Tabelle 4. Die Korrelationen zwischen den einzelnen Borstenloci

paar	Versuch III			Versuch I			Versuch II			Ganzes Material		
	Anzahl Zuchten	Anzahl Seiten	P	Anzahl Zuchten	Anzahl Seiten	P	Anzahl Zuchten	Anzahl Seiten	P	Anzahl Zuchten	Anzahl Seiten	P
hDC	20	900	<0,0001	26	1294	<0,0001	26	1078	<0,0001	72	3272	<0,0001*
P	20	900	0,55									
hNP	20	900	0,13									
uPA	20	900	<u>0,039</u>	31	1550	0,45	27	1122	~0,70	78	3572	0,09 *
oPA	16	718	0,50									
hNP	20	900	0,40									
uPA	20	900	0,20									
oPA	16	718	0,10	24	1160	0,10	15	200	0,32	55	2260	<u>0,013</u> *
uPA	20	900	>0,70									
oPA	16	718	0,45									
uPA	16	718	~0,70									
hDC	16	718	0,34	25	1118	0,11	16	640	~0,70			*
hS							17	624	<u>0,037</u>			*
vS							12	416	0,40			

* Ganzes Material ausgewertet (nicht berücksichtigte Zuchten $\pm$ ohne Ausfälle, daher praktisch ohne Information).

Unterstrichene Ziffern = Korrelation gesichert oder wahrscheinlich (s. Text).

nicht als bereits gesichert gelten (eine Ausweitung der Untersuchung auf weitere Serien und die andern Versuche liefert praktisch keine weitere Information, weil dort die betreffenden Borsten nur selten fehlen). Sicherer scheint die — zudem negative! — Korrelation zwischen der P und der oPA. Eine solche negative

Korrelation wäre wohl am ehesten durch die Inhomogenität des Materials innerhalb der Zuchten erklärbar, ähnlich wie für die links-rechts-Korrelation. Und zwar müßten sich die Einzelzuchten im einfachsten Fall aus 2 Typen von Tieren zusammensetzen, die sich im Verhältnis der Wegfalltendenzen in den beiden Loci unterscheiden.

Das zumindest quantitativ von den übrigen Borstenpaaren sehr verschiedene Verhalten der DC mag an sich erstaunlich sein; trotzdem überraschte dieses Ergebnis nicht sehr. Bereits früher (ROSIN 1952) und ebenso im hier verwerteten Material wurden bei den *Pl*-Tieren häufig Verschiebungen der Dorsozentralen in der Längsrichtung des Tieres (und nur in dieser) beobachtet. Wenn die eine DC fehlt, nimmt die andere oft eine auffällige Zwischenlage bezüglich der normalen Standorte ein. Dieses Verhalten wurde auch bei der Mutante *achaete* beobachtet (STERN 1954). Besonders aufschlußreich können ferner Tiere mit der Normalzahl von zwei DC sein: Sie zeigen öfters eine ausgeprägte Lagebeziehung, d. h. sie stehen entweder beide relativ weit vorn oder umgekehrt. Diese Tatsache allein beweist die Abhängigkeit in der Bildung dieser beiden Borsten. Augenfällige Verschiebungen anderer Borsten wurden in diesen Versuchen nicht festgestellt. Übereinstimmend damit zeigen die aus dem umfangreichen Material errechneten Korrelationskoeffizienten die Sonderstellung der DC innerhalb des betrachteten Borstenmusters.

c) *Die Korrelation zwischen Flügeldefekt und Borstenwegfall.* In einem der folgenden Abschnitte (S. 301) werden die Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer einerseits und Körpergröße, Borstenwegfall oder Flügeldefekt andererseits dargestellt. Jene Untersuchung wird sich aus dort angeführten Gründen auf ausgewählte Serien des Versuches II stützen. Es war nun sinnvoll, hier dasselbe Material zu benutzen. Für eine sichere Beantwortung der gestellten Frage mußten allerdings noch weitere Temperatur-Futter-Kombinationen beigezogen werden; damit ist die Aussage auch von allgemeinerer Gültigkeit. Der berechnete mittlere Korrelationskoeffizient (mittels *z*-Transformation — s. SNEDECOR 1946, S. 154) ist gesichert positiv ($P < 0,01$; $\bar{r} = +0,280$).

IV. Die Körpergröße

Es fällt mit bloßem Auge auf, daß die in Mangelfutter sich entwickelnden Larven zu wesentlich kleineren Imagines werden als solche aus Futter mit Hefeüberfluß. In einer Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Milieu und Manifestation ist somit die Körpergröße als hierfür unter Umständen bedeutungsvolle Variable mitzuberücksichtigen. In den Versuchen I und II wurden deshalb sämtliche *Pl*-Weibchen gemessen. Die Gesamtlänge der Tiere ist als Maß ungeeignet, wegen der beim gleichen Tier sehr veränderlichen Größe und Form des Abdomens. Als günstiges Maß erwies sich hingegen die Thoraxlänge.

Ihre Messung erfolgte im Auflichtmikroskop mit Meßokular. Jedes zu messende Tier wurde aus der Konservierungsflüssigkeit (Alkohol 70%) zum Abtrocknen auf Filtrierpapier gebracht, dann von der Ventralseite her mit einer gefaßten Minutiennadel gespießt und diese in eine dafür hergerichtete, allseitig kippbare Auflicht-Objektklemme-WILD gesteckt. So ließen sich die Tiere auf einfachste Weise in jene Lage bringen, bei der die Meßachse in der Abbildungsebene liegt (s. Abb. 14). Die Thoraxlängen sind in Meßokular-Einheiten (ME) angegeben, wobei $48\frac{1}{2}$ ME einem Millimeter entsprechen.

Die mittleren Thoraxlängen der verschiedenen Versuchsserien finden sich in Tabelle 2 (S. 288), ebenso ihre dritten Potenzen (V), wobei der Wert für Normalbedingungen (A-25) in Versuch I gleich eins gesetzt ist. Bei gleicher Körperform für alle verwendeten Milieus dürfte der Wert V ein gutes Maß für das Körpervolumen und als solches eine biologisch sinnvollere Größe als die Thoraxlänge darstellen.

Daß die Körperform über verschiedene Milieus unverändert bleibt, ist nicht von vorneherein zu erwarten. Oft haben Unterschiede in der Entwicklungstemperatur Formdifferenzen

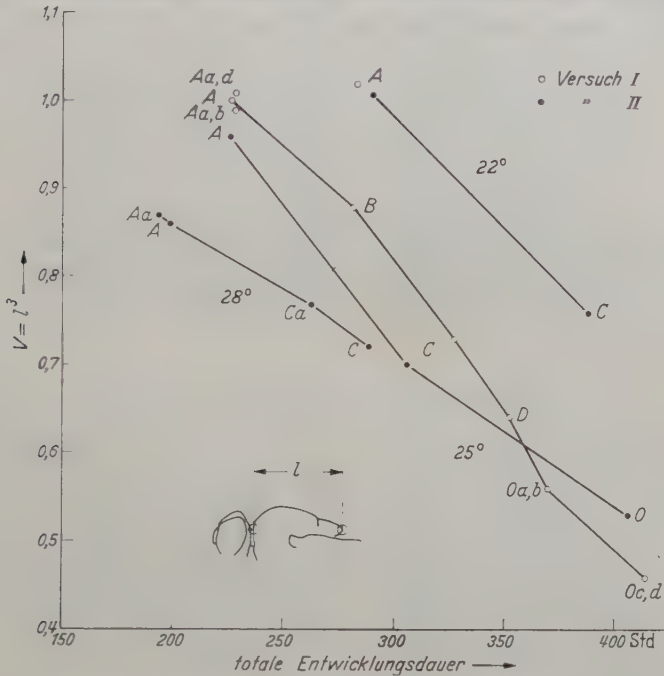


Abb. 14. Die mittlere Körpergröße (V) der *Pl*-♀♀ in den Serien der Versuche I und II

zur Folge (vgl. PRECHT 1955, S. 119). Diese Erscheinung ist auch für bestimmte Körperbereiche von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. So ist beispielsweise die Temperaturabhängigkeit der Länge des Wild-Flügels stärker als jene der Tibia- oder Femurlänge (ALPATOV und PEARL 1929, IMAI 1933, RIEDEL 1934). Als Maß der Körpergröße wurde von verschiedenen Autoren (z. B. den beiden letztgenannten) Tibia oder Femur gewählt, von NADLER (1927) unter anderem auch die Thoraxlänge, worüber jedoch genauere Angaben in seiner Arbeit fehlen.

Innerhalb der einzelnen Zuchttemperaturen zeigt sich eine sehr klare Abhängigkeit des Körpervolumens vom Hefemangel und damit auch von der Entwicklungsdauer (Abb. 14). Und zwar fällt das Volumen in 25° unter extremen Mangelbedingungen auf rund die Hälfte ab (dies entspricht einer Reduktion der Körperlänge um ein Fünftel). Die Unterschiede sind für sämtliche aufeinanderfolgenden Serien innerhalb derselben Temperatur sehr gut gesichert, mit Ausnahme der drei A-Serien bei 25° in Versuch I (Hefeüberfluß, mit oder ohne Vitamin T), die in Körpergröße und Entwicklungsdauer praktisch keine Unterschiede zeigen, und den beiden A-Serien in 28° C. Hier herrschen also wesentlich übersichtlichere Verhältnisse als für die entsprechende Darstellung der Defekte

(Abb. 10, S. 290). Offensichtlich besteht aber bei konstanter Temperatur eine weniger enge Korrelation zwischen Entwicklungsdauer und Körpervolumen, als zwischen Futterbedingungen und Körpervolumen. Dies geht daraus hervor, daß in den beiden Versuchen die 25°-Kurven, die behandlungsgemäß in ihrem Verlauf übereinstimmen sollten, wesentliche Abweichungen voneinander zeigen. Diese sind zudem ähnlich jenen in Abb. 10, vor allem jenen für die Borsten; allen drei Darstellungen ist jedenfalls der durchschnittlich steilere Kurvenverlauf für Versuch I gemeinsam. Da nun beispielsweise Borstendefekt und Körpervolumen ja sehr verschiedenartige Entwicklungsmerkmale sind, ist eine echte, also ursächlich dermaßen enge Korrelation zwischen ihnen nicht anzunehmen. Auch daraus muß geschlossen werden, daß die gleichbehandelten Zuchtserien der beiden Versuche, wenn zwar nicht sichtbare, so trotzdem bedeutungsvolle Milieuunterschiede aufwiesen, die zu einer solch auffallenden Scheinkorrelation führten.

Neben der Abhängigkeit des Körpervolumens vom Futtertyp besteht auch eine solche von der Temperatur (Abb. 14). Für A- und C-Futter sind die Größenunterschiede zwischen den aufeinanderfolgenden Temperaturstufen sehr gut gesichert, abgesehen vom Unterschied zwischen C-28 und C-25, der im Zufallsbereich liegt.

V. Verpuppungsrate und imaginale Schlüpftrate

Für die vorliegende Untersuchung ist es sehr wichtig, die Entwicklungsraten in den verschiedenen Serien zu kennen. Einerseits, weil sie Auskunft geben über die jeweilige Besiedlungsdichte, welche die Entwicklung der Einzeltiere beeinflussen kann; andererseits, weil sie unter Umständen wichtige Hinweise zur Beurteilung der Entwicklungsdauer, Körpergröße und Defekte, sowie der Bedeutung des Milieus liefern. In diesem Zusammenhang werden auch noch die Anteile des *Pl/+*-Genotypus an den imaginalen Schlüpftraten betrachtet (in den Versuchszuchten waren je zur Hälfte *Pl*- und *Cy*-Tiere zu erwarten — s. Schema S. 276).

In Versuch I sind lediglich die imaginalen Schlüpftraten bekannt. In Versuch II wurden dagegen noch die toten Puppen ausgezählt, so daß sich jeweils auch die Verpuppungsrate ermitteln ließ. Diese ist ein geeignetes Maß für die Besiedlungsdichte, da nach der Verpuppung eine Veränderung der Anzahl lebender Individuen für deren Entwicklung bedeutungslos ist. Die Höhe der verschiedenen Entwicklungsraten in den einzelnen Serien ist aus Abb. 15 ersichtlich. Die abgestorbenen Puppen ergeben sich hier notgedrungen als Prozente der ursprünglichen Individuenzahl (Eizahl), wurden aber bei ihrem rechnerischen Vergleich in sinnvollerer Weise auf die verpuppten Tiere bezogen (in manchen Serien schlüpften ein paar Fliegen unvollständig; in der Abbildung sind sie in den schraffierten Säulen enthalten, wurden aber für die statistische Prüfung der Puppensterberaten weggelassen). Die Überprüfung möglicher Abhängigkeiten der Entwicklungsraten von Milieufaktoren ist im Statistischen Anhang erläutert; sie wurde nur in jenen Fällen durchgeführt, wo die graphische Darstellung solche Abhängigkeiten überhaupt vermuten läßt.

Über die Bedeutung der Milieufaktoren für die Entwicklungsraten geht aus Abb. 15 und Tabelle 5 folgendes hervor:

1. Der Vitamin T-Zusatz: Bei 28° zeigen die Zuchten mit Vitamin eine bedeutend höhere Verpuppungsrate als jene ohne Vitamin bei gleichem Hefegehalt. Gleichzeitig sind sie zwar durch eine höhere Puppensterblichkeit gekennzeichnet, wobei aber die imaginale Schlüpftrate der Vitaminzuchten doch die Ver-

gleichswerte noch gesichert überwiegt. Bei Vitamin T-Zusatz vermögen also mehr Tiere ihre Entwicklung zu vollenden, zudem ist das durchschnittliche Todesalter für die übrigen hinausgeschoben. Eine Steigerung der Schlüpftrate durch Vitaminzusatz ergibt sich auch für die Mangelzuchten bei 25° (Versuch I).

2. Der Hefegehalt: In Versuch I ist bei 25° in den beiden Serien mit verhältnismäßig viel Hefe die Schlüpftrate gesichert größer als in den beiden anderen. Die

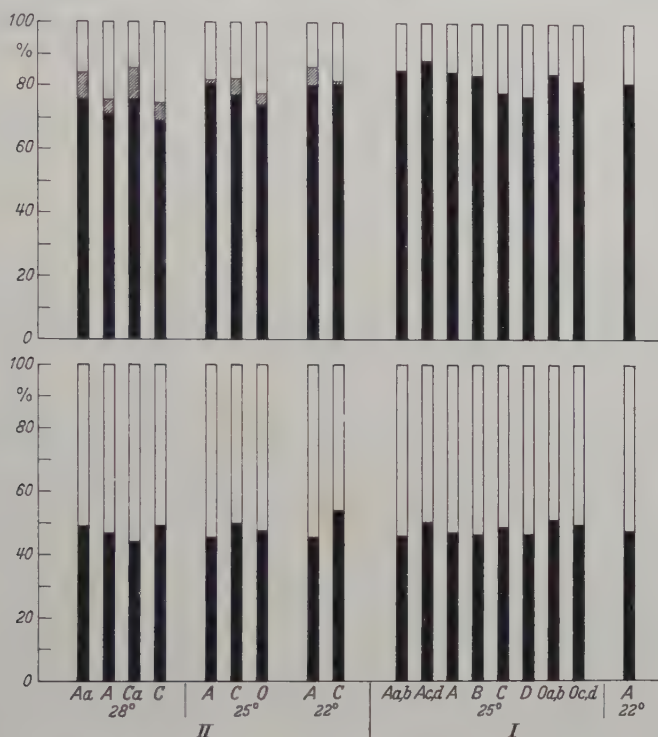


Abb. 15. Die mittleren Entwicklungsraten in den Serien der Versuche I (rechts) und II (links). Oben: schwarz imaginale Schlüpftrate, schraffiert abgestorbene Puppen, schwarz + schraffiert Verpuppungsrate, weiß abgestorbene Larven und Embryonen + unbefruchtete Eier; unten: schwarz *Pl*-Anteil an imaginaler Schlüpftrate (ganze Säule total geschlüpfte Fliegen)

gleiche Tendenz ist bei derselben Temperatur von Versuch II sichtbar. Eine Deutung der anscheinend hefeunempfindlichen Schlüpftrate bei 28° folgt weiter unten.

3. Die Temperatur: Bei vergleichbarem Futter (A oder C) sind die Schlüpf- und Verpuppungsraten in 28° gesichert kleiner als in 25°. Zwischen 25 und 22° fehlen sichere Unterschiede.

4. Der *Pl*-Anteil der geschlüpften Imagines läßt keine sichere Abhängigkeit vom Vitamin T-Zusatz, dem Hefegehalt oder der Temperatur erkennen. Da aber diese Milieufaktoren die Defekte deutlich beeinflussen, wirkt die Defektstärke offenbar nicht auf die Entwicklungsfähigkeit der *Pl*-Tiere. Es kann daher auch kein wesentlicher Zusammenhang zwischen milieubedingter Defektstärke und imaginaler Gesamtschlüpftrate bestehen.

Tabelle 5. *Milieu und Entwicklungsraten*

P-Werte zur Beurteilung von Differenzen zwischen Serien oder Seriengruppen, für sichere Differenzen unterstrichen.

Geprüfter Milieufaktor	Milieu (Versuch)	Imaginale Schlüpfrate	Verpuppungsrate	Puppensterberate	Pl-Anteil an Schlüpf-rate
Vitamin T-Zusatz	Aa-28/A-28 (II)	0,18	<u>0,004</u>	0,033	<u>0,004</u>
	Ca-28/C-28 (II)	0,046 } <u>0,018</u>	<u>0,0003</u>	0,053	
Hefegehalt	A,B-25/C,D-25 (I)	<u>0,002</u>			0,05
	A-25/O-25 (II)	<u>0,033</u>			
	A-22/C-22 (II)		0,13		
Temperatur	A-28/A-25 (II)	<u>0,002</u>	<u>0,023</u>		
	C-28/C-25 (II)	<u>0,012</u>	<u>0,009</u>		
	C-25/C-22 (II)	0,27			

(Die Schlüpf- und Verpuppungsraten beziehen sich auf je 360 Eier je Serie (A,B-25 und C,D-25 je 720), die geprüften Puppensterberaten auf je zwischen 250 und 310 Puppen, die *Pl*-Anteile auf je etwa 290 geschlüpfte Fliegen.)

Wie soeben erläutert, kann auch die *Temperatur*, die ja die Expressivität besonders stark beeinflusst (s. Abb. 10 und 12), nicht über die Defektstärke auf die Schlüpfrate wirken. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß dabei die von der Temperatur abhängige Entwicklungsgeschwindigkeit eine wichtige Rolle spielt (vgl. auch HADORN 1955, S. 126). Unter dieser Hypothese muß aber eine doppelte Wirkung des *Hefegehaltes* auf die Schlüpfrate angenommen werden: Da abnehmender Hefegehalt, entsprechend sinkender Temperatur, die Entwicklungsgeschwindigkeit ebenfalls herabsetzt, würde dadurch die Schlüpfrate erhöht; gleichzeitig besteht aber noch eine entgegengesetzte Wirkung (eben die im Futterversuch bei 25° vorherrschende und damit überhaupt erst sichtbare), welche in einer Schwächung der Tiere bei Futtermangel zu suchen ist. Daraus läßt sich auch die große Ähnlichkeit der Ergebnisse für A- und C-Futter (und zwar bei Vorhandensein oder Fehlen von Vitamin T) bei 28° erklären: die beiden Wirkungen sind hier offenbar mehr oder weniger im Gleichgewicht.

Schließlich stellt sich noch die Frage, ob Unterschiede in der Besiedlungsdichte, wie sie zwischen den einzelnen Serien auftraten, bereits beobachtbare Veränderungen der untersuchten Entwicklungsmerkmale ergeben. In Versuch II wurden sämtliche Differenzen zwischen den Verpuppungsraten gleichbehandelter Zuchten berechnet. Die Flaschenpaare mit den größten Differenzen (bis etwa 10%, was ungefähr $\frac{4}{5}$ der maximalen Differenz zwischen Serien entspricht) wurden mit den zugehörigen Werten für Entwicklungsdauer, Körpergröße und Defekte zusammengestellt. Es ergaben sich keine Beziehungen zur Besiedlungsdichte.

Die Bedeutung dieser kurzen Betrachtung über die Entwicklungsraten für die Hauptfragen der ganzen Untersuchung sei kurz zusammengefaßt.

1. Die gefundenen Verhältnisse machen wahrscheinlich, daß der Hefegehalt — jedenfalls in bezug auf die imaginale Schlüpfrate — zwei einander entgegengesetzte Wirkungen hat.

2. Es ergeben sich keine deutlichen Anhaltspunkte dafür, daß die imaginalen Schlüpfraten der *Pl*- und der *Cy*-Tiere in unterschiedlicher Weise von den Versuchsbedingungen abhängen. Es besteht also kein Verdacht, daß z. B. stark defekte Tiere eine höhere Mortalität haben, was zwangsläufig eine zu geringe Defektabhängigkeit vom Milieu vortäuschen würde.

3. Die Verpuppungsrate, und damit die Larvendichte im Futter, ist temperatur- und futterabhängig. Sie schwankt in unseren Versuchen jedoch höchstens im Verhältnis von etwa 7:8, was, wie sich zeigte, für die Entwicklungsdauer, Körpergröße und Defektbildung hier ohne Bedeutung ist.

VI. Korrelationen zwischen den verschiedenen Entwicklungsmerkmalen und zwischen Milieu und Entwicklung

1. Die Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer, Körpergröße und Defekten innerhalb der Zuchten

Für die Individuen ein und derselben Zucht, also unter Ausschluß der Wirkung von Faktoren des Außenmilieus, bestehen mancherlei Beziehungen zwischen den einzelnen Entwicklungsgrößen. Bis jetzt wurden erst solche zwischen den Defekten näher untersucht (Abschnitt III, 5). Dabei wurde festgestellt, daß sich eine allfällige Inhomogenität des Genmilieus in positiven Scheinkorrelationen auswirken kann (S. 293). Dies gilt selbstverständlich auch für die hier noch zu betrachtenden Korrelationen.

Es wird im folgenden nach Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer, Körpergröße, Borstenwegfall und gesamtem Flügeldefekt gefragt. Für die Überprüfung dieser Frage wurden zwei Serien des Versuches II ausgewählt, und zwar Mangelfutter-Serien, weil im Normalfutter die Entwicklungsdauer-Streuung sehr gering ist. Zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten siehe SNEDECOR (1946, S. 154).

Wie Tabelle 6 zeigt, bestehen für alle geprüften Merkmalspaare gesicherte positive Korrelationen. Zudem sind diese durchgehend immerhin so stark, daß sie sich kaum durch die angenommene, geringe genetische Heterogenität erklären lassen, sondern auf wirkliche Beziehungen zwischen den betrachteten Größen hinweisen. Auf die Art dieser Beziehungen, z. B. auf Wirkungsrichtungen, läßt sich aber aus den gefundenen positiven Korrelationen allein nicht schließen. Vor allem darf die Entwicklungsgeschwindigkeit nicht ohne weiteres als primäre Größe angesehen werden, da sie nicht wie beim Vergleich der verschiedenen Serien eines ganzen Versuchs im wesentlichen durch die Milieubedingungen experimentell gegeben ist (dieses Problem ist im nächsten Abschnitt näher behandelt).

Tabelle 6. Die Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer (*E*), Thoraxlänge (*L*), Borstenwegfall (*B*) und Flügeldefekt (*F*) innerhalb der Zuchten (Versuch II, Mangelfutter bei 25° C)

Zucht		Anzahl Tiere	Korrelations-Koeffizienten			
			r_{EL}	r_{EB}	r_{EF}	r_{LB}
C-25	1	28	+0,812	+0,352	+0,286	+0,396
	2	24	0,390	0,076	0,405	0,298
	3	20	0,347	0,516	0,477	0,488
O-25	1	15	0,587	0,151	0,437	0,131
	2	18	0,811	0,458	0,605	0,563
	3	27	0,681	0,446	0,673	0,448
N		132				
$\bar{r}$			+0,649	+0,335	+0,489	+0,403
P			<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Es wäre somit verfehlt, weitere Aufschlüsse in der Berechnung von Teilkorrelationen (Korrelationen zwischen je zwei Merkmalen unter Ausschluß der übrigen beiden) zu suchen.

2. Vergleich der Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer und Borstenwegfall bei konstantem und bei variiertem Futter

Zuchten mit verschiedenem Hefegehalt des Futters unterscheiden sich im allgemeinen in ihrer mittleren Larven-Entwicklungsdauer und *Pl*-Expressivität. Daneben zeigen aber auch die einzelnen Individuen derselben einheitlichen Zucht eine gewisse Streuung in diesen beiden Entwicklungsmerkmalen. Für beide Betrachtungsebenen ergaben sich sichere Korrelationen zwischen Entwicklungsdauer und *Pl*-Expressivität. Währenddem aber im Futterversuch mit zunehmender Entwicklungsdauer (als Folge abnehmenden Hefegehaltes) die Defekte im allgemeinen kleiner werden, ergab sich umgekehrt *innerhalb* einiger daraufhin geprüfter Zuchten eine positive Korrelation zwischen Defekten und Entwicklungsdauer. Entsprechende Verhältnisse fanden sich bei der Gegenüberstellung von Entwicklungsdauer und Körpergröße. Im folgenden werden nun für das Merkmalspaar Entwicklungsdauer und Borstenwegfall die beiden Korrelationen mit Hilfe der Regressionsanalyse nach HALD (1952, S. 579; s. ROSIN und NEF und Ergänzungen dazu im Statistischen Anhang) für einen übereinstimmenden Milieubereich verglichen.

Die Regressionsanalyse wurde für die Gesamtheit der 25⁰-Zuchten des Versuchs I durchgeführt (der für dieses Material gültige Futterbereich ist z. B. aus Tabelle 2, S. 288, ersichtlich). Die Analyse gestattet folgende Aussagen (man

Tabelle 7. Zur Streuungsanalyse Entwicklungsdauer/Borstendefekt
Erläuterungen siehe Text.

Siehe entsprechende Ziffern im Text	Gesamt-Material (m = 28, N = 696)			Gruppe 1, Serien A—C (m = 17, N = 417)			Gruppe 2, Serien D—O (m = 11, N = 279)		
	Streuungen	Freiheitsgrade	P (für F-Tests)	Streuungen	Freiheitsgrade	P	Streuungen	Freiheitsgrade	P
—	$s_1^2 = 2,4$	640	—	2,5	383	—	2,2	257	—
1.	$s_2^2 = 2,9$	27	> 0,05						
2.	$s_3^2 = 5,4$	26	~ 0,001	3,2	15	> 0,05	4,5	9	< 0,05
									> 0,01
3.	($s_4^2 = 78,0$	1	< 0,001)	9,4	1	~ 0,05	31,3	1	< 0,001
5.	$s_2'^2$ —	—	—				4,2	1	0,04*
6.	$s_4'^2$	1	0,028		1	0,13		1	0,08
7.	$s_4'''^2$				1	0,09		1	< 0,001

* In F-Test Vergleich mit $s_1^2 = 2,4$ mit 640 Freiheitsgraden.

vergleiche hierzu die in Tabelle 7 unter den entsprechenden Ziffern aufgeführten Streuungen und *P*-Werte der betreffenden F-Tests):

1. Die Regressionen für die einzelnen Zuchten dürfen unter sich als parallel gelten.

2. Die Mittelwerte für die einzelnen Zuchten sind nicht linear angeordnet. Dieses Resultat beruht im wesentlichen auf der Knickung der Entwicklungsdauer.

Borstendefekt-Kurve in C-25 (s. Abb. 10, S. 290). Die weitere Betrachtung macht deshalb eine Unterteilung des Gesamtmaterials in die Gruppen 1 und 2 notwendig (s. Tabelle 7). Gruppe 1 ist linear, Gruppe 2 scheint eher unlinear; doch ist ihr Kurvenverlauf so geartet, daß es durchaus sinnvoll erscheint, eine Regressionsgerade zu berechnen und auch ihre Neigung zu prüfen.

3. Die mittlere Regression innerhalb der Zuchten ist von der Regression ihrer Mittelwerte gesichert verschieden. Diese allgemeine Aussage muß jedoch eingeschränkt werden; bei gesonderter Betrachtung der beiden Gruppen gilt sie nur für die zweite.

Neben diesen eigentlichen 3 Kriterien der Regressionsanalyse sind noch die Art und die Signifikanz der Regressionen von Interesse.

4. Die Regression der Zuchtenmittel ist negativ, die durchschnittliche Regression innerhalb der Zuchten dagegen positiv.

5. Ein wirklicher Unterschied der beiden Gruppen in der Regression der Mittelwerte läßt sich nicht mit Sicherheit nachweisen.

6. Die durchschnittliche positive Regression innerhalb der Zuchten ist schwach gesichert. Für die einzelnen Gruppen läßt sich der Nachweis nicht führen (die Aussage unter 1., über die Parallelität der Einzelregressionen, ist für die Gruppen-Betrachtung unverbindlich, da die Reihenfolge der Zuchten und damit ihrer Regressionen in jenem Test unberücksichtigt bleibt).

7. Die Regression der Zuchtenmittel ist lediglich in Gruppe 2 sicher von Null verschieden.

Aus der mittleren Regression in den Einzelzuchten läßt sich die durchschnittliche Korrelation zwischen Entwicklungsdauer und Borstendefekt der Individuen berechnen. Für den Vergleich mit der entsprechenden Korrelation aus Versuch II auf S. 301 interessiert vor allem der Wert für ungefähr denselben Bereich der Entwicklungsdauer, also für die Serien B bis Oc.d. Aus den insgesamt 420 Tieren ergibt sich eine gesicherte durchschnittliche Korrelation ($P = 0,01$) von der Größe $\bar{r} = +0,126$ (Berechnung, s. SNEDECOR 1946, S. 154).

Für die weitere Betrachtung der Zusammenhänge zwischen Entwicklungsdauer und Defekten sind vor allem folgende Ergebnisse wichtig:

a) Bei futterbedingter Änderung der Entwicklungsdauer ist diese mit dem mittleren Borstendefekt der Zuchten negativ korreliert.

b) Umgekehrt besteht innerhalb der Zuchten eine positive Korrelation zwischen Entwicklungsdauer und Borstendefekt.

c) Die Korrelation innerhalb ist mit $\bar{r} = 0,126$ gesichert schwächer ($P = 0,006$) als jene in Versuch II mit $\bar{r} = 0,335$ für den entsprechenden Entwicklungsdauerbereich.

C. Diskussion

I. Allgemeine Bemerkungen zu Milieu und Entwicklung

1. Das Zuchtmilieu

Die Betrachtung des *Außenmilieus* beschränkte sich auf die Faktoren Temperatur, Futter und Besiedlungsdichte, die für die Entwicklung unserer Fliegen von großer Bedeutung sind. Experimentell variiert wurden lediglich die Zuchttemperatur und der Gehalt des Futters an Trockenhefe und Vitamin T. Daneben ergaben sich aber zwischen den Zuchten ungewollte Unterschiede im Futter und

in der Besiedlungsdichte (Verpuppungsrate). Letztere waren vor allem durch die Verschiedenartigkeit der Zuchtmilieus bedingt; da sie keinerlei Beeinflussung der Manifestation und der anderen Entwicklungsmerkmale erkennen lassen, darf der Faktor Besiedlungsdichte in der nachfolgenden Betrachtung über die Variabilität der *Pl*-Manifestation vernachlässigt werden. Dasselbe gilt auch für die milieubedingten Unterschiede in der imaginalen Schlüpftrate, da jene nicht auf Mortalitätsunterschieden zwischen schwach- und starkdefekten Tieren beruhen.

Die nachgewiesene Inhomogenität des *Innenmilieus* der Tiere (Genmilieu) bleibt dagegen zu berücksichtigen, da sie beim quantitativen Vergleich von zwei Entwicklungsmerkmalen, oder eines Milieufaktors mit einem Entwicklungsmerkmal, innerhalb der Zuchten zu Scheinkorrelationen führen kann.

Den unseren vergleichbare Versuche mit gestuftem Hefegehalt der Zuchten sind uns aus der Literatur keine bekannt. Wohl wurde von verschiedenen Autoren die normale Entwicklungsdauer der Larven durch Futtermangel verlängert und die Auswirkungen auf Mutantenmerkmale untersucht. So z. B. durch BRAUN (1942), der aber die Larven in bestimmten Entwicklungsstadien auf Peptonfutter umsetzte („partial starvation“) oder ihnen das Futter zeitweise gänzlich entzog („complete starvation“). Zuchten, die sich durch verschiedenen Hefegehalt unterschieden, verwendete zwar auch NOZAWA (1956), erhielt aber gleichzeitig sehr große Unterschiede in den Populationsdichten, die die Entwicklung zusätzlich stark beeinflussten. Dies geht z. B. deutlich daraus hervor, daß von seinen 3 Hefemangelstufen die extreme die größten Tiere lieferte. Der einzig durch die Hefekonzentration bedingte Einfluß auf die Expressivität ist deshalb schwer abzuschätzen. Grundsätzlich gleichartige Versuche wie NOZAWA, machten KHOUVINE, EPHRUSSI und CHEVAIS (1938, Tabelle 4, S. 432), wobei sich aber im Gegensatz zu oben, dank besonderer Verhältnisse (ausgewählte Zuchten mit extrem verschiedenem Hefegehalt aber ähnlicher Besiedlungsdichte) eine auf der Hefekonzentration beruhende Beeinflussung der Expressivität (Augenfarbe) eindeutig nachweisen ließ. Und schließlich fand bereits NORTROP (1917, Tabelle 2, S. 184) in einem ähnlichen Versuch mit *Wild*-Fliegen die Futterunabhängigkeit der Puppendauer.

2. Das Optimalmilieu der Normalentwicklung

Bei der Behandlung der Entwicklungsdauer wurde ihre relative Streuung als Maß der Futtergüte betrachtet (S. 282), weil die Vergrößerung der relativen Streuung nichts anderes als eine zunehmende Störung des „Normalen“ bedeute. Wenn wir diesen Gedanken verallgemeinern, läßt sich folgende Definition anschließen: *Das Optimalmilieu für die Entwicklung des Individuums ist jenes, das die geringsten relativen Streuungen der verschiedensten Entwicklungsmerkmale ergibt*, d. h. jenes, in dem sich kleine Zufallsdifferenzen zwischen den Individuen am wenigsten auswirken können.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung werden sonst allerdings diejenigen Bedingungen als optimal bezeichnet, welche die höchste Entwicklungsgeschwindigkeit oder für den gesamten Entwicklungszyklus die kürzeste Entwicklungsdauer ermöglichen. Dies mag öfters auch erfüllt sein, wenn man ganz allgemein unter optimalen Bedingungen jene versteht, die in möglichst kurzer Zeit zu einer möglichst großen Population führen; so nennt PRECHT (1955, S. 89) die populationsmäßig günstigste Temperatur „Die“ Optimaltemperatur.

In unserer Untersuchung ist deshalb neben dem Streuungsverlauf der Entwicklungsdauer auch jener der Thoraxlänge zu berücksichtigen und schließlich noch der Verlauf der imaginalen Schlüpftrate. Es wäre sinnwidrig, ein Milieu als optimal zu bezeichnen, in welchem die Aufwachs-Chance für das Individuum nicht maximal ist. Dagegen müssen die *Pl*-Defekte hier außer Betracht bleiben,

schon deshalb, weil in einem bestimmten Milieubereich gar keine in Erscheinung treten und damit eine Streuungsbetrachtung unmöglich ist.

Vergleichen wir die in Tabelle 2 (S. 288) zusammengestellten Werte der relativen Streuungen von Entwicklungsdauer und Thoraxlänge sowie in Abb. 15 (S. 299) die imaginalen Schlüpfraten, so läßt sich das Milieu A-25 (Hefeüberfluß bei 25°) für die Entwicklung des Individuums zwangslos als das optimale unter den überhaupt verwendeten erkennen.

3. Die Entwicklung bei Mangelfutter

In unseren Versuchen ist es gelungen, mittels Mangelfutter eine Verlängerung der normalen Gesamtentwicklungsdauer um das 1,8fache zu erzielen (Tabelle 2, S. 288). Da Embryonal- und Puppendauer (1 und 4 Tage) futterunabhängig sind, entspricht dies einer Verlängerung der Larvenzeit um das 2,7fache. Erstaunlicherweise wird aber dadurch die imaginale Schlüpftrate kaum verändert; wohl fällt sie mit sinkendem Hefegehalt des Futters schwach ab, was aber durch Beigabe von Vitamin T kompensiert werden kann (s. Abb. 15, S. 299).

Überhaupt scheinen die *Pl*-Weibchen sowohl bei starkem Futtermangel wie auch bei sehr starken Defekten (in 28° C) ebenso vital wie die Kontrolltiere. Offenbar hat das *Pl*-Gen keine den Gesamtorganismus schädigenden Auswirkungen. Darin unterscheidet sich unsere Mutante z. B. auffällig von der Mutante *lozenge-clawless* (*lz^{cl}*, HADORN und ANDERS 1946), die sich neben mancherlei morphologischen Defekten durch allgemein kurze Lebensdauer auszeichnet und unter schlechten Zuchtbedingungen zur Bildung von Kümmerfliegen neigt (ANDERS 1955).

Die Möglichkeit sehr starker experimenteller Beeinflussung der Entwicklungsdauer bei praktisch gleichbleibender Schlüpftrate war für die vorliegende Arbeit von überragender Bedeutung. Dies vor allem deshalb, weil damit der Faktor „Besiedlungsdichte“ vernachlässigt werden konnte (s. S. 301). Ferner war aber auch von Bedeutung, daß die Versuchsserien mit Mangelfutter bei gleichem Aufwand an Zuchten (der aus technischen Gründen nicht wesentlich hätte gesteigert werden können) auswertbares Material ähnlicher Größe wie die Normalzuchten lieferten.

Daß eine so weitgehende Konstanz der Entwicklungsraten nicht von vornherein zu erwarten ist, zeigt der Vergleich mit einer Arbeit von GLOOR (1950). Dort wurde Mangelfutter aus Agar und Trockenhefe (also ohne Zucker und Mais wie bei unserem), im einen Versuch unter Zusatz von Al_2O_3 , verabreicht. Aus der Gegenüberstellung in Tabelle 8 geht hervor, daß bei GLOOR die futterbedingte Verlängerung der Entwicklungsdauer von einer ganz bedeutenden Verringerung der Schlüpftrate begleitet war. Allerdings verhielten sich die daraufhin geprüften 28 Stämme im gleichen Futter und bei gleicher Temperatur wesentlich verschieden. So zeigten ein paar Mutanten mehr oder weniger normale relative Aufwachsrate (Anzahl Fliegen bezogen auf larvale Schlüpfzahl), jedoch bei einer Verlängerung der Entwicklungsdauer um nur höchstens $2\frac{1}{2}$ Tagen. Andererseits ergaben zwei Mutanten mit extremer Verlängerung der Entwicklungsdauer um etwa 4 Tage relative Aufwachsrate von nur 12 und 15%. Das zeigt deutlich, daß sich verschiedene Mutanten auf demselben Mangelfutter sehr verschieden verhalten. Damit ist aber nicht gesagt, daß die Mutante *Pl* auf dem von GLOOR verwendeten Futter die für uns so günstige Entwicklungssituation zeigen würde.

Wenn in unserem Futter mit verhältnismäßig geringem Hefegehalt die Schlüpftrate beinahe unverändert blieb, könnte dabei von Bedeutung gewesen sein, daß unsere Eier nicht sterilisiert waren und die Zuchten Mais und Zucker enthielten. Aus der Arbeit von GLOOR geht übrigens andernorts noch hervor, daß sich eine sehr hohe Besiedlungsdichte (eine doppelt so hohe als die in Tabelle 8 angegebene) in bezug auf die Schlüpftrate katastrophal auswirken kann.

Tabelle 8. *Imaginale Schlüpftrate und Entwicklungsdauer bei verschiedenem Mangelfutter (25°C)*

Eierdichte für alle Zuchten gleich groß (GLOOR: 50 Eier auf 5 cm³ Futter; NEF: 120 Eier auf 12 cm³ Futter).

Verlängerung der Entwicklungsdauer heißt: gegenüber der normalen Entwicklungsdauer (bei uns für A-25).

Art des Mangelfutters (sterilisiert)		Hefe- Kon- zentra- tion (mg/ cm ³)	Anzahl Zuch- ten	Ima- ginale Schlüpf- rate %	Ent- wick- lungs- dauer- Ver- länge- rung Tage	
GLOOR (Wildstamm <i>Oregon</i>)	Eier sterilisiert					
	Agar + Trockenhefe	{ mit Al ₂ O ₃	10	5	50	1
		{ ohne Al ₂ O ₃	8	32	25	4 ¹ / ₂
NEF (Mutante <i>Pearl</i>) (Versuch I)	Eier nicht sterilisiert					
	Agar + Mais + Zucker + Trockenhefe	{ B-25	5	3	84	1 ¹ / ₂
		{ C-25	2,5	3	78	4
		{ D-25	1,25	3	77	5
	wie oben, aber ohne Hefe und mit Vitamin T	{ Oa,b-25	0	4	84	5 ¹ / ₂
		{ Oc,d-25	0	4	82	8

Soll die Entwicklung bei Mangelfutter möglichst gut gekennzeichnet werden, müssen wir alle erfaßten Entwicklungsmerkmale berücksichtigen. Hierzu sei u. a. darauf verwiesen, was bereits auf S. 297 über Entwicklungsdauer und Körpergröße und auf S. 290 über die Defekte in verschiedenem Milieu gesagt wurde. Aus der gesamthaften Betrachtung ergeben sich dann folgende wichtige Punkte:

1. Die Puppen-Entwicklungsdauer bleibt auch bei extremem Mangelfutter dieselbe wie bei Hefeüberfluß. Eine allgemeine Schädigung oder Schwächung der Tiere durch die Mangelbedingungen scheint somit nicht zu bestehen.

2. Die Larvendauer ist bei extremem Futtermangel sehr stark verlängert; die Tiere verpuppen sich indessen zu einem Zeitpunkt, da die Körpermasse noch viel geringer ist als die bei der Verpuppung in hefereichem Futter. Es besteht also ein Kompromiß zwischen Entwicklungsdauer und Körpergröße. Doch findet die Verpuppung auch hier in einem Zustand des Organismus statt, der den Ablauf der Metamorphose in der normalen Zeit gestattet. Dies legt nahe, daß der allgemeine Entwicklungszustand der verpuppenden Mangelfutter-Larven harmonisch ist, d. h. derselbe wie bei den verpuppenden Hefeüberfluß-Tieren.

3. Die imaginale Schlüpftrate ist erstaunlicherweise weitgehend unabhängig vom Futtermangel. Jedenfalls kann sie auch bei extremer Verlängerung der Entwicklungsdauer auf gleicher Höhe wie unter normalen Bedingungen gehalten werden.

4. Es ergibt sich die paradox anmutende Tatsache, daß in „schlechterem“ Milieu, d. h. bei Futtermangel, die Defekte geringer sind. Dies wird in einem späteren Abschnitt noch diskutiert (S. 309). Hier sei lediglich betont, daß für die Entwicklung der *Pl*-Tiere nicht ein bestimmtes, allgemein gültiges Optimalfutter existiert. Futter mit Hefe im Überfluß ist dank der kurzen Entwicklungsdauer möglicherweise optimal in populationsgenetischer Hinsicht — falls nicht gleichzeitig andere, hier nicht betrachtete Faktoren, wie z. B. solche der Fertilität, ungünstig verändert sind; extremes Mangelfutter fördert hingegen die Entstehung möglichst defektfreier Tiere. Allerdings ist eine damit verbundene, positive populationsgenetische Wirkung nicht ausgeschlossen, auch abgesehen von der bereits erwähnten Fertilität; vielleicht wären die homozygoten Tiere unter solchen Bedingungen (und unterstützt durch eine tiefe Zuchttemperatur), entgegen den bisherigen Befunden bei „gutem“ Futter, gelegentlich vital.

II. Die Variabilität der *Pl*-Manifestation bei konstantem und bei variiertem Milieu

1. Das Verhalten der einzelnen Borstenloci

Die in der vorliegenden Untersuchung an Einzelborsten gewonnenen Einblicke erfahren eine wertvolle Ergänzung durch zwei bis dahin unausgewertete Versuche von ROSIN zur *temperaturempfindlichen Phase der Borstenbildung* (vgl. Abb. 16), die wir deshalb hier ausführlich erörtern.

Es wurden ältere Larven aus der anfänglichen Zuchttemperatur von 18° in eine solche von 27° C gebracht und nach erfolgter Verpuppung einzeln in kleinen Röhrchen gehalten. Damit ist für jedes Tier bekannt, zu welchem Zeitpunkt vor der Verpuppung der Temperaturwechsel stattgefunden hatte. Die 0—11 Std vor der Verpuppung umgesetzten Tiere des Versuches A sind hier, ihrer geringen Anzahl wegen, zu Gruppen von 2—3 Std zusammengefaßt. Die Kurven für fünf Borsten (*vNP*, *vSA*, *oPA*, *vDC* und *vS*) sind in Abb. 16 weggelassen, da sie gleichmäßig sehr niedere Ausfallhäufigkeiten von höchstens 0,2 haben.

Betrachten wir vorerst die Kurven von Versuch A. Drei Borsten (*hNP*, *hSA*, *uPA*) verhalten sich auffallend ähnlich. Werden die Tiere erst kurz vor der Verpuppung in die hohe Temperatur gebracht, ist der Borstenwegfall klein, geschieht dies jedoch früher, so nimmt er erwartungsgemäß zu. Überraschend ist hingegen die Tatsache, daß bei noch früherem Temperaturwechsel die Wegfallrate wieder abnimmt. Aus der Durchführung des Versuches (s. oben), ergibt sich aber, daß die Tiere mit frühem Temperaturwechsel solche mit langer Entwicklungsdauer sind. Es fragt sich nun, ob diese Tiere dank langsamerer Entwicklung einen kleineren Wegfall zeigen, oder ob beides, langsamere Entwicklung und geringerer Borstendefekt, durch einen weiteren, hier nicht erfaßten Faktor, z. B. des Futters, bedingt sind. In Versuch B zeichnet sich zudem im untersuchten Zeitbereich eben noch die Tendenz ab, daß bei sehr spätem Temperaturwechsel, nämlich nach Ende der eigentlichen temperaturempfindlichen Phase, die Wegfallhäufigkeit wieder anwächst. Diese ebenfalls unerwartete Erscheinung weist in derselben Richtung, da sie im Gegensatz zur erstgenannten die Tiere mit verhältnismäßig kurzer Entwicklungsdauer betrifft.

Unsere Interpretation des Gesamtverlaufes der betrachteten Kurven ist in Abb. 17 schematisch dargestellt. Einerseits ist die Wegfalltendenz einer bestimmten Borste in der hohen Temperatur wesentlich größer als in der tiefen, anfänglichen Zuchttemperatur; andererseits ist die Wegfalltendenz derselben Borste in Tieren mit langer Entwicklungsdauer, d. h. mit niedriger Entwicklungsgeschwindigkeit (im Schema die jungen Tiere, also links), kleiner als in solchen mit kurzer Entwicklungsdauer. Letzteres gilt in unseren Hauptversuchen zwar nur für die experimentell bedingten Entwicklungsdauer-Differenzen; für die Einzeltiere ein und derselben Zucht ergab sich die gegenteilige Tendenz. Dabei handelte es sich aber im Gegensatz zu den hier betrachteten Versuchen um mäßig besiedelte Zuchten, die zudem Nipagin

und Terramycin enthielten. So ist anzunehmen, daß sich hier das Milieu bis zum Versuchsende wesentlich stärker verändert hatte. Damit ist aber in der Korrelation zwischen Entwicklungsdauer und Borstenwegfall auch jene Tendenz zu erwarten, die sich im Futterversuch

ergab und die hier offenbar überwiegt, nämlich sinkender Defekt mit zunehmender Entwicklungsdauer.

Ein auffällig anderes Bild als die bisher besprochenen Borsten zeigt die hS. Im untersuchten Bereich ist lediglich ein langsam aber deutlich steigender Verlauf der Ausfallhäufigkeit erfaßt, dessen Interpretation auf Schwierigkeiten stößt. Die kritische Phase muß, verglichen mit obigen Fällen, sehr früh oder sehr spät (erst nach der Verpuppung) liegen; letzteres dürfte wahrscheinlicher sein, da die Wegfallrate bei frühzeitigem Temperaturwechsel innerhalb eines relativ langen Intervalls gleichmäßig tief ist. Sicher, und für unsere Betrachtung wichtig, ist jedenfalls, daß die kritische Phase gegenüber jener für die vorher untersuchten Loci verschoben ist.

Beim Vergleich der Versuche A und B fällt auf, daß sich die Werte für die uPA weitgehend decken, jedoch für die hNP und die hSA gleichsinnig verschoben sind; dasselbe gilt auch für die hS unter der Annahme, daß ihre kritische Phase nach der Verpuppung sei. Dies könnte übrigens auch bei den bis jetzt nicht diskutierten, weniger klare Verhältnisse zeigenden P und

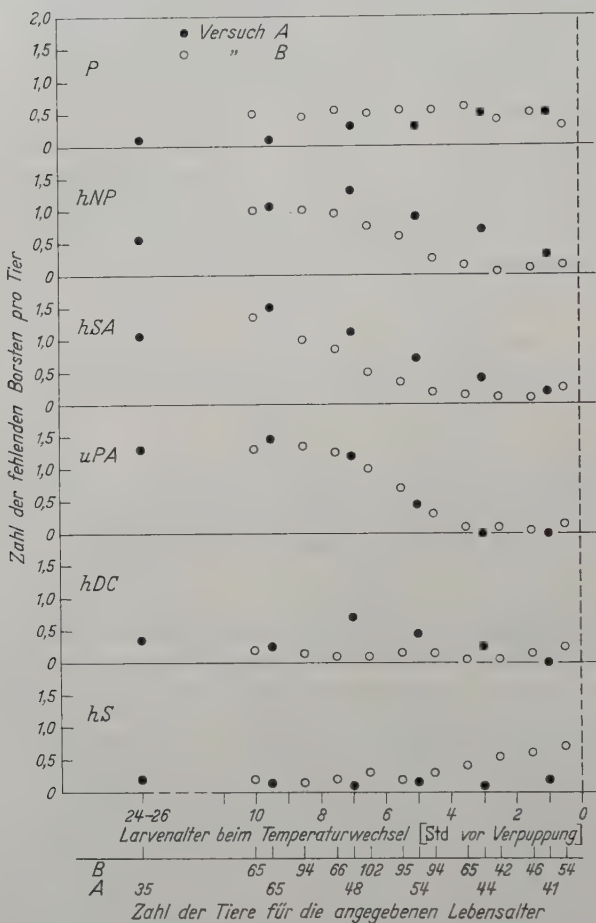


Abb. 16. Der Wegfall verschiedener Borsten bei Temperaturwechsel (18 → 27° C) in verschiedenem Larvenalter

hDC zutreffen. Der verschiedene Verlauf der Kurven in den beiden Versuchen beruht vermutlich darauf, daß die Zucht B wesentlich stärker besiedelt war als A. Daraus ergeben sich offenbar zeitliche Verschiebungen zwischen der temperaturempfindlichen Phase und dem Auftreten der Pyknosen in der betreffenden Region der Imaginalscheibe. Ferner müßte angenommen werden, daß diese zeitlichen Verschiebungen für die verschiedenen Borsten, d. h. für die verschiedenen Bereiche der Imaginalscheibe ungleich wären.

Zusammenfassend ergeben die verschiedenen Betrachtungen über Einzelborsten 4 wesentliche Resultate:

a) Die Temperaturabhängigkeit des Wegfalls einer bestimmten Borste kann sich von Futter zu Futter stark ändern und ist in manchen Fällen nicht linear (s. Abb. 12, S. 292).

b) Der Verlauf der Wegfallhäufigkeit für eine bestimmte Temperatur- oder Futterreihe wechselt auffällig von Locus zu Locus.

c) Die temperaturempfindliche Entwicklungsphase ist nicht für alle Borstenloci dieselbe (s. oben, Abb. 16).

d) Im Wegfall der beiden Dorsozentralen besteht eine sichere Korrelation (s. S. 294).

Die festgestellte Korrelation für die DC ist neben ihrer auffälligen Lage- und Größenbeziehung (s. S. 296) und dem speziellen Verhalten der hDC in *achaete*-Mosaiktieren (STERN 1954) Ausdruck des für dieses Borstenpaar bestehenden gemeinsamen Determinationsfeldes. Anhaltspunkte für weitere Borstenfelder ergeben sich aus dieser Arbeit keine, was aber nicht gegen eine allfällige Existenz spricht. Sie müssen sich nicht auffällig in einer Korrelation der Ausfallhäufigkeiten ausdrücken: auch für das DC-Paar ist ja diese Korrelation recht schwach. In die Annahme, daß dem ganzen thorakalen Borstenmuster ausgedehnte Determinationsfelder zugrunde liegen, fügt sich auch die gefundene Tatsache zeitlicher Verschiebungen zwischen den temperaturensiblen Phasen der Einzelborsten gut ein. Wir können annehmen, daß im Thoraxteil der Imaginalscheibe vorerst wenige primäre Borstenbildungsfelder bestehen; diese werden dann durch die Determination einzelner Borsten an bestimmten Stellen abgesättigt, wodurch neue Feldgipfel entstehen, die ihrerseits zu weiteren Borstendeterminationen Anlaß geben. So entstünde ein kompliziertes örtliches und zeitliches Determinationsmuster. Und daraus erklärten sich die zeitlichen Unterschiede zwischen den temperaturempfindlichen Phasen der einzelnen Borsten, da anzunehmen ist, daß sich die Pyknoseanfälligkeit auf eine bestimmte, kurze Bildungsphase des Borstenapparates beschränkt.

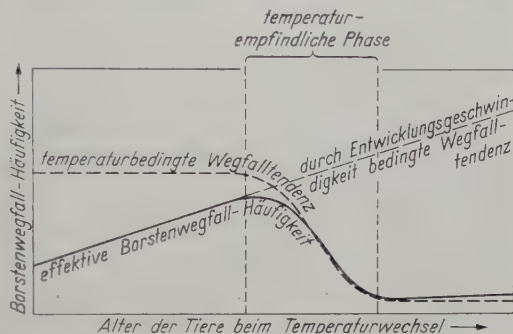


Abb. 17. Schema zum Verlauf der Wegfallhäufigkeit einer Einzelborste in einer Population verschieden schnell sich entwickelnder Tiere bei einmaliger Erhöhung der Zuchttemperatur

2. Entwicklungsdauer und Manifestation

Im Temperaturversuch sinkt im allgemeinen die Expressivität mit abnehmender Temperatur; andererseits sinkt die Expressivität im Futterversuch im allgemeinen mit zunehmendem Hefemangel. Daß die Defekte bei „schlechterem“ Futter kleiner sind, mag erstaunlich sein. Da aber sowohl sinkende Temperatur wie zunehmender Futtermangel die Entwicklungsdauer verlängert, wurde zu Beginn unserer Versuche die Hypothese aufgestellt, daß die Expressivität vor allem durch die Entwicklungsgeschwindigkeit bestimmt werde. Abb. 10 (S. 290) zeigt aber, daß im gleichen Versuch und bei gleicher Gesamtentwicklungsdauer, etwa der Serien C-28 und A-22, oder ähnlicher Larvenentwicklungsdauer (Tabelle 2, S. 288; Serien Ca-28 und A-22) — die maßgeblicher ist, da zur Zeit der

Verpuppung die Defekte schon weitgehend festgelegt sind — die Defekte sehr verschieden stark sein können. Dabei ist aber vorerst zu berücksichtigen, daß zwischen den verglichenen Serien auch die Körpergrößen auffällig schwanken (Abb. 14, S. 297). Vergleichen wir deshalb zwei Serien mit sehr ähnlicher Larvendauer und zugleich sehr ähnlicher Körpergröße (C-28 und C-25), so sind aber auch hier bedeutende Expressivitätsunterschiede festzustellen, vor allem für den Flügel. Die Expressivität wird also offensichtlich nicht durch die larvale Entwicklungsgeschwindigkeit oder die Körpergröße oder eine Kombination beider Entwicklungsmerkmale bestimmt. Anders gesagt, läßt sich in bezug auf das Manifestationsbild einer Zucht die Milieubeschreibung niemals durch die Angabe der Entwicklungsdauer (als Maß für die Entwicklungsgeschwindigkeit) und der Körpergröße vertreten. Dazu sei noch betont, daß sämtliche Zuchtmilieus innerhalb durchaus biologischer Grenzen lagen.

Daß die — in unserer rein biometrischen Arbeit nicht direkt analysierbare — Wirkungskette, die sich von den experimentell gegebenen Außenbedingungen zur endgültigen, sichtbaren Genmanifestation hinzieht, weit komplexer ist, als vorerst angenommen wurde, zeigen auch die folgenden Tatsachen. Die futterbedingte Änderung der Entwicklungsdauer kann in der einen Temperatur von wesentlich anderen Defektunterschieden gefolgt sein als in einer anderen, und zwar auch bei übereinstimmendem Entwicklungsdauer-Bereich; so sinkt der Borstenwegfall in Versuch II (Abb. 10, S. 290) von A-25 nach O-25, währenddem er von A-22 nach C-22 ansteigt. Ferner kann die Expressivität innerhalb einer Futterreihe zuerst ansteigen, dann aber abfallen (bei 28° für Borsten und Flügel; Flügel bei 25° in Versuch I). Daraus muß geschlossen werden, daß die Defektbildung durch mindestens zwei Faktoren gesteuert wird. Auf komplizierte Verhältnisse stoßen wir schließlich auch beim Vergleich des Verlaufes von Expressivität und Spezifität der Flügelmerkmale. Die bezüglich Entwicklungsdauer und Defektwert extremen Serien A-28 und O-25 in Versuch II (Abb. 10) stimmen gut überein in der örtlichen Verteilung der Perlen und Randausschnitte (Abb. 9, S. 286), währenddem in der Normalserie A-25 diese Defekte deutlich proximaler liegen.

Weitere Einblicke gestattet die Regressionsanalyse, die für den Borstendefekt bei 25° in Versuch I durchgeführt wurde (S. 302). Für die Mittelwerte der Zuchten herrscht eine negative Korrelation vor, d. h. die Defekte nehmen mit zunehmender Entwicklungsdauer ab, währenddem innerhalb der Zuchten eine positive Korrelation besteht, die Defekte also mit zunehmender Entwicklungsdauer ansteigen (dieselben Verhältnisse gelten auch für den Gesamtflügeldefekt). Dies zeigt wiederum eindrucklich, daß keine einheitliche Entwicklungsdauer-Defekt-Beziehung besteht. Im ersten Fall ist die Entwicklungsdauer eine primäre Größe, denn ihre Verlängerung bei zunehmendem Futtermangel ist eine allgemeine Erscheinung; dies bedeutet aber noch keineswegs, daß die Expressivität eine Folgegröße der Entwicklungsgeschwindigkeit sei. Die individuellen Entwicklungsgeschwindigkeiten der Larven innerhalb der Zucht sind jedoch nicht experimentell bedingt; auch im homogenen Tiermaterial sind die Entwicklungsmerkmale mit „zufälligen“ Streuungen behaftet. Daß hier die beiden streuenden Größen korreliert sind, heißt, daß für sie entweder eine direkte Abhängigkeit besteht, oder daß sie durch eine dritte streuende Größe gleichsinnig beeinflusst werden.

Es liegt nahe, daran zu denken, daß zwischen Entwicklungsdauer und Expressivität zwei direkte, entgegengesetzt gerichtete Wirkungen vorkommen: Einerseits

eine Abhängigkeit der Defektbildung von der Entwicklungsgeschwindigkeit und andererseits eine Abhängigkeit der Entwicklungsgeschwindigkeit von der Defektsituation in den Flügel-Imaginalscheiben. Innerhalb der Zuchten würde die Wirkung von seiten der Defekte überwiegen, da diese bedeutend stärker streuen als das „Normalmerkmal“ Entwicklungsgeschwindigkeit. Diese Wirkung müßte nun aber bei der Betrachtung der Zuchtenmittel eines ganzen Futtersversuchs wegen der sehr bedeutenden, experimentell bedingten Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit verdeckt bleiben. Auf diese Weise ließen sich die erhaltenen Ergebnisse gut erklären.

Der Vergleich der Entwicklungsdauer bei *Pl*- und *Cy*-Tieren (Abb. 5, S. 281) läßt nun allerdings keine Rückwirkung der Defektherde auf die Entwicklungsdauer erkennen. Diese nimmt bei Veränderung des Futters in beiden Genotypen denselben Verlauf, obschon für *Pl* nach dem Gesagten eine Modifizierung durch die stark variierende mittlere Defektstärke zu erwarten wäre. Ebenso sprechen die Streuungsverhältnisse der Entwicklungsdauer in den beiden Genotypen (Abb. 6, S. 282) gegen eine Rückwirkung der Defekte auf die Entwicklungsgeschwindigkeit.

Die Möglichkeit, daß die Korrelation innerhalb der Zuchten auf Heterogenitäten des Genmaterials oder des Futters beruhen könnten, muß ausgeschlossen werden. Bereits die kleine relative Streuung der Entwicklungsdauer bei Normalfutter (2%) zeigt, daß diese Heterogenitäten hier zumindest keine bedeutsame Rolle spielen.

Wenn wir annehmen, daß die Korrelation zwischen Entwicklungsdauer und Borstendefekt innerhalb der Zuchten Ausdruck einer echten Beziehung zwischen Entwicklungsgeschwindigkeit und Defektbildung sei, so wäre diese doch eine recht lockere. Zudem wäre sie ziemlich empfindlich auf genetische Unterschiede oder auf Futterunterschiede, denn zwischen den Versuchen I und II ergab sich eine sichere Differenz der Korrelationskoeffizienten (S. 303). Das Bestimmtheitsmaß ($= r^2$) ist für den Versuch mit der stärkern Korrelation (Versuch II) 0,112; betrachten wir die eine Entwicklungsgröße als primär, ließe sich bei der anderen also nur rund $\frac{1}{10}$ ihrer Variabilität durch die Veränderung der Primären erklären.

Zusammenfassend läßt sich über mögliche Beziehungen zwischen Entwicklungsgeschwindigkeit und Defekten nur soviel sagen:

1. Die experimentelle Änderung der Entwicklungsgeschwindigkeit im Temperatur- oder Futtersversuch wirkt sich vielleicht direkt auf die Defektbildung aus; etwa so, daß eine geringere Entwicklungsgeschwindigkeit eine weitgehendere Ausregulierung der primären Defekte in den Imaginalscheiben gestattet. Diese Beziehung wäre aber von der speziellen Temperatur-Futter-Kombination stark abhängig.

2. Ebenso ist eine direkte Beziehung zwischen den beiden betrachteten Entwicklungsmerkmalen innerhalb der Zuchten fraglich und höchstens von geringem Ausmaß. Sicher beruht aber die festgestellte Korrelation nicht auf Heterogenitäten im Außenmilieu oder im Genmilieu. Dagegen könnte es sich z. B. um geringe, zufällige Vitalitätsunterschiede zwischen den einzelnen Tieren handeln, welche sich auf die Defektbildung und die Entwicklungsgeschwindigkeit gleichsinnig auswirken.

3. Und schließlich ergeben sich keinerlei Anhaltspunkte für eine Rückwirkung der Defekte in den Imaginalscheiben auf die Entwicklungsgeschwindigkeit.

III. Die Flügelrand-Defekte bei Mutanten und Modifikationen.

Allgemeine Bemerkungen zur Mutante *Pearl*

Die bei unserer Mutante festgestellten Abnormitäten des Flügelrandes finden sich in mehr oder weniger ähnlicher Form nicht nur bei manchen anderen Mutanten, sondern auch als Modifikationen. Eine eingehendere Betrachtung dieses Merkmals ist deshalb von besonderem Interesse.

1. Vergleich der Randdefekte der Mutante *Pl* und der Nitrogen-Mustard (NM)-Modifikationen von BERTSCHMANN

Schon zu Beginn dieser Untersuchung fiel die Ähnlichkeit der *Pl*-Flügel (bei Außerachtlassen der Perlen) mit Flügeln von Wild-Fliegen aus (damals ebenfalls noch in Gang befindlichen) Phänotypversuchen mit Nitrogen-Mustard von MAY BERTSCHMANN (1955) auf. Der folgende Vergleich stützt sich auf ihre Beschreibung des NM-modifizierten Flügels (S. 236) und die zugehörigen Flügelzeichnungen (Abb. 2, S. 237); zum *Pl*-Flügel siehe vor allem unsere Abb. 8 und 9 (S. 285 und 286).

Betrachten wir vorerst die *Verteilung* der Randdefekte. Sowohl im NM- wie auch im *Pl*-Flügel treten die Ausschnitte am Hinterrand bedeutend häufiger auf als am Vorderrand und an der Flügelspitze. Ferner finden sich die haarlosen Randstellen ohne eigentliche Kerben übereinstimmend am häufigsten an der proximalen Umbiegungsstelle des Flügelhinterrandes. In bezug auf die *Defekstärke* fällt auf, daß die extremen NM-Stufen durch *Pl* bei weitem nicht erreicht wurden. In den *Eigentümlichkeiten der Kerbenform* und der *Beborstung des Flügelrandes* herrscht eine weitgehende Übereinstimmung von NM und *Pl*. Die Kerben sind am proximalen Hinterrand meist relativ schwach konvex, jene zwischen den Längsadern II und III sowie IV und V meist asymmetrisch und zwar proximal konvexer als distal. Die Randborsten kommen am Vorderrand auch bei Fehlen der Randader und am Hinterrand an deutlich „eingezogenen“ Stellen vor. Die Beborstung ist in unmittelbarer Kerbennähe meist auffallend stark ausgebildet; nach BERTSCHMANN handelt es sich dabei um einen „dichten Besatz von starken Borsten“, bei den *Pl*-Flügeln wurde dagegen vor allem eine Verdichtung des Borstenbesatzes (Abb. 8i) festgestellt. Neben der gestaltlichen Ähnlichkeit der NM- und *Pl*-Flügel ergibt sich zudem eine gute Übereinstimmung der geprüften *sensiblen Phasen*; sie liegen für etwa 27° C zwischen 18 und 12 Std vor der Verpuppung.

Ein auffälliger Unterschied zwischen Modifikation und Mutante scheint in der Temperaturabhängigkeit der Merkmalsausprägung gegeben. Dies könnte leicht zu falschen Schlüssen führen. Vergleichbare Temperaturstufen haben wir nicht; wir wissen lediglich, daß die Modifikation bei 13° ab Behandlungsende (nach anfänglich 27½°) weitgehender ist als bei ständig 27½°, die *Pl*-Expressivität der Flügelkerben bei 22° jedoch geringer als bei 25°. Offensichtlich hat aber die Zuchttemperatur von 13° bereits einen, der normalen Temperaturabhängigkeit entgegengesetzten, defektfördernden Kälteeffekt, der ganz allgemein oft dem Hitzeeffekt entspricht. Wie wir aber von GOLDSCHMIDT (1935a) wissen, besteht dieser bei bestimmter Temperaturhöhe (35° C) und einer sensiblen Phase, die sich mit jener für die NM-Behandlung deckt, sehr häufig in denselben Flügelranddefekten, wie sie für die NM-Modifikationen und die *Pl*-Mutante beschrieben wurden.

2. Allgemeine Betrachtungen zu den Flügelrand-Defekten und zur Mutante *Pl*

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel gesagt wurde, kommen Randausschnitte des Flügels in zahlreichen Mutanten vor (s. hierzu z. B. die vergleichende Beschreibung in GOLDSCHMIDT 1935b, ferner die Flügelbilder von *scalloped* und *notchy* in GRÜNEBERG 1929). Ferner ergeben sich solche Flügelformen nicht nur als NM-, sondern auch als Hitzemodifikationen (GOLDSCHMIDT 1935a).

Die genetisch oder modifikatorisch bedingten Randdefekte können neben wesentlichen Unterschieden im Angriffsmuster oder in der ausfallenden Flügelfläche in besonderen Eigentümlichkeiten auffällig übereinstimmen. Solche Gleichheiten weisen auf allgemeine Entwicklungsprinzipien hin. Bei der erwähnten Verstärkung des Borstensaumes an den Kerbenenden handelt es sich wohl um eine Antwort auf die streckenweise Unterdrückung der Borstenbildung. BERTSCHMANN (1955) macht im gleichen Zusammenhang aufmerksam auf den ebenfalls häufig beobachteten Fall, daß eine Körperborste besonders stark entwickelt ist, wenn normalerweise vorhandene Nachbarborsten nach NM-Behandlung fehlen. Der Hinweis auf eine feldmäßige Entwicklung des Flügel-Borstensaumes scheint gerechtfertigt, da dieser zeitlich lange nach dem Erscheinen der Randausschnitte gebildet wird (GOLDSCHMIDT 1935b). Zur eingangs erörterten Übereinstimmung in speziellen Kerbenformen bestimmter Flügelzonen ließe sich an einen Zusammenhang mit dem Zelldichtemuster des Flügels (s. SATZ 1951) denken. Hierzu muß allerdings betont werden, daß die Kerben höchst wahrscheinlich nicht durch Hemmung der Epithelbildung zustande kommen, sondern sekundär durch Abbau aus der vorerst normal ausgebildeten Flügelplatte entstehen, entsprechend den von GOLDSCHMIDT (1935b) untersuchten „Kerben-Mutanten“ mit relativ schwacher Flügelreduktion.

Die Tatsache, daß es sich bei der Flügelkerbe um einen genetischen oder modifikatorischen und dabei sehr gen- bzw. behandlungs-unspezifischen Defekt handeln kann, zeigt, daß er auf einer Störung des Entwicklungsgeschehens beruht, die sich aus den verschiedensten Einflüssen erklären lassen muß. Nach GOLDSCHMIDT (1935a) ist diese Störung im Zusammenspiel der mannigfachen Reaktionsabläufe zu suchen, verursacht durch die Veränderung ihrer spezifischen Geschwindigkeiten. Dabei muß bei den Modifikationen das normale Zusammenspiel in ähnlicher Weise abgewandelt sein wie in den entsprechenden Mutanten. Dies trifft nur unter ganz bestimmten Bedingungen zu: bei der Hitzemodifikation nur für bestimmte Höhe und Dauer des Temperaturreizes, bei der NM-Modifikation wohl entsprechend für bestimmte Konzentration und Einwirkungsdauer der Lösung, und in beiden Fällen nur für die Behandlung während einer bestimmten sensiblen Entwicklungsphase. Zudem spielt allgemein das Genom und die Entwicklungstemperatur eine bedeutende Rolle.

Man mag nun noch nach genaueren Aussagen zur *Phänokopierung* der „Flügelkerben-Mutanten“ fragen. BERTSCHMANN betont, daß sich ihre NM-modifizierten Tiere nicht eindeutig einer einzelnen der zahlreichen, Flügelkerben verursachenden Allelserien zuordnen lassen. Zwar werden in diesen die Flügel von schwach zu stark expressiven Genen nach ganz bestimmten Angriffsmustern beschnitten (GOLDSCHMIDT 1935a). Aber „die Variationsbreite der modifikatorischen Flügelkerben ist viel größer als diejenige der mutativen eines einzelnen Gens, sowohl in bezug auf ihr Angriffsmuster als auch in bezug auf ihre Expressivitätsstufen“ (BERTSCHMANN, S. 236). Vergleichen wir NM-Behandlung und *Pl*-Gen, so gilt auch hier, daß die Variationsbreite für die Expressivität bei den Modifikationen sehr viel größer ist; zu einem tief in die Flügelfläche hineinreichenden Wegfall des ganzen Hinterrandes kam es bei unserer Mutante (bei den gegebenen Innen-

und Außenbedingungen) bei weitem nicht. In bezug auf die Angriffsmuster scheint dagegen die modifikatorische Variationsbreite nicht größer zu sein als die mutative, auch wenn wir bei letzterer von einem konstanten Zuchtmilieu ausgehen. Weiten wir den Vergleich auf das ganze Manifestationsmuster der Mutante *Pl* aus, ist vor allem bemerkenswert, daß die Borstenwegfälle auch als NM-Modifikation vorkommen (ROSIN 1949, BERTSCHMANN 1955); und zwar stellen sie dort nach BERTSCHMANN, jedenfalls an Kopf und Thorax, den häufigsten Fall unter mancherlei anderen Borstenabnormitäten dar. Dabei ist hervorzuheben, daß sich bei all den Flügelkerben-Mutanten, die sich unter den (z. T. Sammel-) Bezeichnungen *Beaded*, *Beadex*, *Notch*, *notchy*, *scalloped* und *vestigial* finden, offenbar nie fehlende Thoraxborsten registriert wurden (BRIDGES and BREHME 1944). Ferner betont GOLDSCHMIDT (1935a), daß in seinen umfassenden Versuchen mit Hitzebehandlung alle von den Mutanten her bekannten Borstenabnormitäten beobachtet wurden, nie aber Borstenwegfälle. Dies gilt zwar nicht ganz für spätere Hitzebehandlungsversuche von BUCHMANN und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1938) und von HENKE, v. FINCK und MA (1941). Beide Autoren stellten jedoch neben richtigen Borstenwegfällen vor allem auch verkleinerte Borsten fest. Und beim erstgenannten Autor (der verkleinerte und fehlende Borsten getrennt auführt) kommen fehlende Borsten auch für die diesbezüglich günstigste Behandlungsphase relativ selten vor. Bei der Mutante *Pl* wurden dagegen stark verkleinerte Borsten überhaupt nicht festgestellt, bei den NM-Modifikationen von BERTSCHMANN aber nur „gelegentlich“, neben den als „häufig“ bezeichneten Borstenwegfällen. Nach all dem Gesagten liegt die Versuchung nahe, in der Wirkung der NM-Behandlung vor allem eine *Pl*-Phänokopie zu erblicken; auch dann, wenn die für den *Pl*-Flügel besonders typischen Perlen nach NM-Behandlung nie auftraten, Aderabnormitäten (BERTSCHMANN 1952, Abb. 3) aber nur bei gleichzeitiger Haltung in tiefer Temperatur (13° C). Da im übrigen die Behandlungsergebnisse für mehrere, gänzlich voneinander unabhängige *melanogaster*-Wildstämme „überraschend einheitlich“ ausfielen, beruht die Übereinstimmung zwischen Mutante und Modifikation sicher nicht auf einem zufällig außerordentlich „*Pl*-günstigen“ Genom der NM-modifizierten Tiere.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die NM-Modifikationen im Entwicklungsbereich der Flügel-Imaginalscheibe eine *Pl*-spezifische Kombination zweier sehr verschiedener Phäne (Flügelkerben und Wegfall dorso-mesothorakaler Borsten) kopiert. Daneben finden sich in demselben Entwicklungsbereich auch ausschließlich entweder NM- oder *Pl*-bedingte Merkmale (die NM-Borstenmißbildungen und bei *Pl* zumindest die Perlen). Nebenbei sei als „historische“ Eigentümlichkeit erwähnt, daß also mit der Publikation der Bertschmannschen NM-Modifikationen die ausführliche Beschreibung einer Phänokopie vor derjenigen ihres — heute — angepaßtesten mutativen Vorbildes erschien.

Kehren wir schließlich noch einmal zu den Flügelrand-Defekten zurück. Es ist auffällig, daß sie durch sehr unterschiedliche Behandlungsarten erhalten werden, einerseits durch physikalische (Hitze), andererseits durch chemische (NM). Hitze gehört nach GOLDSCHMIDT (1945) zu jener Gruppe extremer Umwelteinflüsse, welche Mutanten mit quantitativen Störungen des Stoffwechsels (Veränderung von Reaktionsgeschwindigkeiten) kopieren. Offenbar greifen aber in entsprechender Weise auch gewisse Chemikalien, die allgemein im Hinblick auf

die Phänokopierung von Mutanten mit qualitativ verändertem Stoffwechsel angewendet werden, in das Entwicklungsgeschehen ein.

Zusammenfassung

1. Die Mutante *Pearl (Pl)* von *Drosophila melanogaster* zeichnet sich im wesentlichen durch fehlende Thoraxborsten sowie Abnormitäten des Flügels (sog. Perlen, Randausschnitte und zusätzliche Aderstücke) aus.

2. Die Versuchstiere wurden unter verschiedenen Temperatur- und Futterbedingungen aufgezogen und die Abhängigkeit der *Pl*-Manifestation und allgemeiner Entwicklungsmerkmale vom Milieu untersucht.

Die *Pl*-Manifestation:

a) Im allgemeinen nimmt der Borstenwegfall und der Gesamt-Flügeldefekt mit sinkender Temperatur und sinkendem Hefegehalt des Futters ab.

b) Die einzelnen Borstenloci sprechen auf die Milieuänderungen sehr verschieden an.

c) Die Perlen, Randausschnitte und Aderabnormitäten zeigen in den verschiedenen Milieus verschiedene bevorzugte Flügelregionen.

Allgemeine Entwicklungsmerkmale:

d) Die Zunahme der larvalen Entwicklungsdauer mit sinkender Temperatur und sinkendem Hefe- und Vitamin T-Gehalt ist näher untersucht.

e) Die Puppendauer ist nur von der Temperatur abhängig, nicht aber vom Hefegehalt.

f) Die Körpergröße nimmt mit steigender Temperatur und sinkendem Hefe- und Vitamin T-Gehalt ab.

g) Bei der angewandten Versuchsmethodik zeigen Verpuppungsrate und imaginale Schlüpftrate für den ganzen betrachteten Milieubereich nur eine verhältnismäßig geringe Temperatur- und Futterabhängigkeit.

3. Die Untersuchung von Korrelationen im Defektmuster gibt zu Erörterungen über das Problem der Homogenität eines Tiermaterials Anlaß und liefert einen Beitrag zur Frage der Bildung des thorakalen Borstenmusters:

a) Aus dem Vergleich von links- und rechtsseitigem Borstenwegfall gelingt der Nachweis einer bestehenden Inhomogenität innerhalb der einzelnen Zuchten, die vermutlich genetischer Natur ist.

b) Die beiden Dorsozentralborsten sind in ihrer Wegfalltendenz deutlich positiv korreliert, womit sich die bereits früher auf anderem Wege gewonnene Erkenntnis eines gemeinsamen Bildungsfeldes bestätigt. Für das übrige thorakale Borstenmuster ergeben sich keine solchen Felder.

4. Es wird versucht, aus den Korrelationen zwischen Milieufaktoren, *Pl*-Manifestation und allgemeinen Entwicklungsmerkmalen Aufschlüsse über wirkliche Beziehungen zwischen diesen Größen zu erhalten.

a) Die Borsten- und Flügelexpressivität nimmt im allgemeinen mit experimentellbedingt zunehmender Entwicklungsdauer ab; dasselbe gilt für die Körpergröße.

b) Im Gegensatz dazu nimmt der Borstenwegfall innerhalb der Zuchten mit zunehmender Entwicklungsdauer zu.

c) Direkte Zusammenhänge zwischen Entwicklungsgeschwindigkeit und *Pl*-Manifestation lassen sich nicht sicher nachweisen; jedenfalls spielt aber die

spezielle Temperatur-Futter-Kombination für die Expressivität eine überragende Rolle.

5. Aus den Streuverhältnissen von Entwicklungsdauer und Körpergröße und der Höhe der imaginalen Schlüpftrate wird ein Optimalmilieu für die Entwicklung des Individuums abgeleitet. Es liegt bei 25°C und unserem heferreichsten Futter (A).

6. Der Vergleich des gesamten Defektmusters der Mutante *Pl* mit anderen Mutanten und mit Modifikationen zeigt, daß die Randdefekte und Borstenausfälle in auffallendem Maße mit Nitrogen-Mustard phänotypiert werden können.

Statistischer Anhang

Es werden im folgenden die gebrauchten statistischen Grundgrößen zusammengestellt und kurz erläutert; dies soll vor allem eine rasche Orientierung in der mathematischen Behandlung des Zahlenmaterials ermöglichen, die ohnehin dadurch erschwert ist, daß die statistischen Symbole oft von Autor zu Autor wechseln. Ferner werden ein paar nicht allgemein bekannte Verfahren kurz dargestellt. Die üblichsten Prüfmethode (normaler χ^2 -Test, *t*- und *F*-Test), sowie solche, die in der Literatur leicht zugänglich sind (LINDER 1951, SNEDECOR 1946), bleiben hier unerwähnt.

a) Statistische Maßzahlen.

Mittlerer Fehler des Mittelwertes
(Standard Error)

$$= m = \pm \sqrt{\frac{s^2}{N}}$$

mittlere Streuung aus mehreren Gruppen

$$= \bar{s} = \sqrt{\frac{SSQ}{S(N-1)}}$$

relative mittlere Streuung = $\frac{\bar{s}}{\bar{x}_{\text{total}}}$

mittlerer Fehler der Differenz zweier Mittelwerte

$$= m_d = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$$

x = Einzelwert

$\bar{x}$ = Mittelwert

N = Anzahl Einzelwerte

$SQ = Sx^2 - \frac{(Sx)^2}{N}$ = Summe der Abweichungsquadrate

$s^2 = \frac{SQ}{N-1}$ = Quadrat der Streuung der Einzelwerte (Variance)

s = Streuung der Einzelwerte (Standard Deviation)

b) Prüfung der Differenz zweier Mittelwerte (zu Tabelle 2, S. 288).

Hier genügt (an Stelle des vollständigen *t*-Tests) meist der Vergleich der Mittelwertdifferenz mit ihrem mittleren Fehler. *P* (s. u.) ergibt sich mittels des Wertes d/m_d aus der *t*-Verteilung (Diagramm von PATAU 1943) oder — falls N genügend groß — aus der Normalverteilung. — Dieses Verfahren gilt theoretisch nur für $N_1 = N_2$.

Der Wert *P* bedeutet die Wahrscheinlichkeit dafür, daß unter der Annahme einer rein zufälligen Differenz zwischen zwei betrachteten Werten diese Differenz so groß oder größer als die beobachtete ist.

c) Kombination mehrerer Vierfelder mit stark voneinander abweichenden *p*-Werten, unter Berücksichtigung der Richtung der Differenzen in den einzelnen Vierfeldern (nach COCHRAN 1954) (zu Abschnitt III, 5., a und b).

Für den Fall der links-rechts-Korrelation des Wegfalls einer bestimmten Borste ergibt sich z. B. folgende Vierfeldertafel für die Fliegen einer Einzelzucht:

		rechts		Total	Anteil der Vorhandenen
		vorhanden	fehlend		
links	vorhanden	...	...	N_a	p_a
	fehlend	...	...	N_b	p_b
				N	$\hat{p}$

Ferner sei die Differenz $d = p_a - p_b$ und das Gewicht dieses Vierfeldes $w = \frac{N_a \cdot N_b}{N_a + N_b}$.

Die Beurteilung des Gesamtmaterials beruht auf dem Vergleich der mittleren gewichteten Differenz $\bar{d}$ aus allen Vierfeldern mit ihrem mittleren Fehler $m_{\bar{d}}$:

$$\bar{d} = \frac{S(w \cdot d)}{S w}$$

$$m_{\bar{d}} = \frac{\sqrt{S(w \cdot \hat{q} \cdot \hat{p})}}{S w}, \quad \hat{q} = 1 - \hat{p}.$$

Die gesuchte Wahrscheinlichkeit P , die besagt ob eine gesicherte Korrelation vorliegt oder nicht, ergibt sich schließlich mittels des Wertes $\bar{d}/s_{\bar{d}}$ aus der Normalverteilungs-Tabelle. Dieser P -Wert kann nun benützt werden, um den zugehörigen mittleren Korrelationskoeffizienten $\bar{r}$ anzugeben, damit die Stärke der Korrelation selbst und nicht nur die Wahrscheinlichkeit, mit welcher sie von Null abweicht, für Vergleiche zur Verfügung steht. Aus einem einzelnen Vierfeld ist r als $\sqrt{\frac{\chi^2}{N}}$ zu berechnen. Wenn wir nun danach fragen, wie groß r sein müßte, damit eine Vierfeldtafel mit der Totalzahl von SN Individuen im Homogenitätstest gerade den für die kombinierten Vierfelder gefundenen P -Wert ergibt, so ist damit ein mittlerer Korrelationskoeffizient definiert. Er ist wie folgt zu berechnen:

$$\bar{r} = \sqrt{\frac{\chi_{(1)}^2}{SN}}, \quad \chi_{(1)}^2 = \chi^2 \text{ mit 1 Freiheitsgrad für den gefundenen } P\text{-Wert.}$$

d) Range-Test (zu Abschnitt III. 5. a., s. LE ROY 1956).

Es wird damit beurteilt, ob in einer Serie von Werten die Differenz der beiden Extremwerte (= Range) signifikant ist. In unserem Fall handelt es sich um Korrelationskoeffizienten r . Dann ist

$$q = \frac{\text{Range}}{\text{Fehlerschätzung von } r};$$

der Schwellenwert von q für $P = 0,05$ ergibt sich aus der q -Verteilung (LE ROY, S. 296) für k = Anzahl der r -Werte und v = Freiheitsgrade der Fehlerschätzung.

Wird hier für die Fehlerschätzung von r näherungsweise der r -Wert mit dem größeren Fehler berücksichtigt, so ist

$$q = \frac{\text{Range}}{m_r}, \text{ wobei } m_r = \frac{1 - r^2}{\sqrt{N-1}} = \text{mittlerer Fehler von } r, \text{ und } v = N-1.$$

e) Kombination mehrerer Vierfelder unter Berücksichtigung der Richtung der Differenzen in den einzelnen Vierfeldern (nach COCHRAN 1954, einfachere Methode) (zu Tabelle 5, S. 300).

Falls die N der einzelnen Vierfelder höchstens etwa im Verhältnis 1:2 schwanken und die $\hat{p}$ (siehe c) innerhalb etwa 0,2—0,8 liegen (was hier erfüllt ist), gilt für ihre gesamthafte Beurteilung folgende Größe:

$$\frac{S\chi}{\sqrt{m}}, \quad m = \text{Anzahl der Vierfelder, } P \text{ aus Normalverteilungs-Tabelle.}$$

f) Zur Regressionsanalyse nach HALD (s. S. 302).

Eine übersichtliche Zusammenstellung des Analysenganges findet sich in ROSIN und NEF (1958). Dazu seien hier lediglich die für den Vergleich der Gruppen 1 und 2 und für die Prüfung der Signifikanz von Regressionen notwendigen Ergänzungen aufgeführt. Es sind weitere s_1^2 mit dem gefundenen s_1^2 zu vergleichen; sie ergeben sich aus der wie folgt abgeänderten Formel für SQ_4 :

zu Punkt 5. im Text (S. 303):

$$SQ_4' = (\hat{b}_1 - \hat{b}_2)^2 / \left(\frac{1}{SQ N_{xx} \bar{x}_{xx}} + \frac{1}{SQ N_{\lambda} \bar{x}_{\lambda}} \right)$$

für k Regressionen in Gruppe 1 und l Regressionen in Gruppe 2

zu Punkt 6.: $SQ_4'' = \bar{b}^2 \cdot \mu S SQ x$;

zu Punkt 7.: $SQ_4''' = \hat{b}_1^2 \cdot SQ N_{xx} \bar{x}_{xx}$ bzw. $\hat{b}_2^2 \cdot SQ N_{\lambda} \bar{x}_{\lambda}$.

Literatur

- ALPATOV, W. W., and R. PEARL: Experimental studies on the duration of life. XII. Amer. Naturalist **63**, 37—67 (1929). — ANDERS, G.: Untersuchungen über das pleiotrope Manifestationsmuster der Mutante *lozenge-clawless* (*lz^{cl}*) von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.-Vererb.-Lehre **87**, 113—186 (1955). — BERTSCHMANN, MAY: Phänokopieversuche mit Nitrogen-Mustard an *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **27**, 166—170 (1952). — Versuche zur phänokopierenden Wirkung von Chemikalien (Nitrogen-Mustard u. a.) bei *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 229—266 (1955). — BEZEM, J. J., and F. H. SOBELS: Penetrance and expressivity in the genotype *Abnormal Abdomen* of *Drosophila melanogaster*. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **56**, 48—61 (1953). — BRAUN, W.: The effect of changes in time of development on the phenotypes of mutants of *Drosophila melanogaster*. Univ. Calif. Publ. Zool. **49**, 61—84 (1942). — BRIDGES, C. B., and KATHERINE S. BREHME: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Washington 1944. — BUCHMANN, W., u. N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY: Über die Wirkung der Temperatur auf den Mutationsprozeß bei *Drosophila melanogaster*. V. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **74**, 472—478 (1938). — CLARK, C.: A flotation method for the collection of insect eggs. Dros. Inf. Serv. **22**, 79 (1948). — COCHRAN, W. G.: Some methods for strengthening the common χ^2 -test. Biometrics **10**, 417—451 (1954). — FISHER, R. A.: The theory of inbreeding. London 1949. — GLOOR, H.: Vitalität verschiedener Stämme von *Drosophila melanogaster* bei minimaler Ernährung. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **25**, 508—512 (1950). — GOETSCH, W.: Entdeckung und Bedeutung des Wirkstoffes T. Rev. suisse Zool. **56**, 251—264 (1949). — Beschleunigung der Entwicklungsgeschwindigkeit von *Drosophila* um 20—30%. Naturwissenschaften **40**, 584—585 (1953). — GOLDSCHMIDT, R.: Gen und Außeneigenschaft. I. u. II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **69**, 38—131 (1935a). — Gen und Außencharakter. III. Biol. Zbl. **55**, 535—554 (1935b). — Additional data on phenocopies and genetic action. J. exp. Zool. **100**, 193—201 (1945). — GRÜNEBERG, H.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Röntgenmutationen des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Biol. Zbl. **49**, 680—694 (1929). — HADORN, E.: Letalfaktoren. Stuttgart 1955. — HADORN, E., and G. ANDERS: Dros. Inf. Serv. **20**, 65 (1946). — HALD, A.: Statistical theory with engineering applications. New York and London 1952. — HENKE, K., E. v. FINCK u. S. Y. MA: Über sensible Perioden für die Auslösung von Hitzemodifikationen bei *Drosophila* und die Beziehungen zwischen Modifikationen und Mutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 267—316 (1941). — IMAI, T.: The influence of temperature on variation and inheritance of bodily dimensions in *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **128**, 634—660 (1933). — KALMUS, H.: Diurnal rhythms in the *Axolotl* larva and in *Drosophila*. Nature (Lond.) **145**, 72—73 (1940). — KHOVINE, YVONNE, B. EPRUSSI and S. CHEVAIS: Development of eye colors in *Drosophila*: Nature of the diffusible substances, effects of yeast, peptones and starvation on their production. Biol. Bull. Woods Hole **75**, 425—446 (1938). — LINDER, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler. In: Medizin und Ingenieur. Basel 1951. — NADLER, J. E.: Effects of temperature on length of vestigial wing in *Drosophila virilis*. Genetics **11**, 584—589 (1927). — NEF, W.: Die Bedeutung der Zuchtbedingungen für entwicklungsphysiologisch-genetische Untersuchungen an *Drosophila*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **29**, 272—277 (1954). — NORTHROP, J. H.: The rôle of yeast in the nutrition of an insect (*Drosophila*). J. biol. Chem. **30**, 181—187 (1917). — NOZAWA, K.: The effects of the environmental conditions on *Curly* expressivity in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Genetics **31**, 163—171 (1956). — PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine neue *t*-Tafel). Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943). — PRECHT, H., J. CHRISTOPHERSEN u. H. HENSEL: Temperatur und Leben. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — RIEDEL, HILDA: Der Einfluß der Entwicklungstemperatur auf Flügel- und Tibialänge von *Drosophila melanogaster* (*wild*, *vestigial* und die reziproken Kreuzungen). Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **132**, 463—503 (1934). — ROY, H. L. LE: Zwei bekannte statistische Prüfverfahren im Lichte neuester Erkenntnisse. Schweiz. landw. Mh. **34**, 285—297 (1956). — ROSIN, S.: Chemically induced disturbance of bristle pattern. Dros. Inf. Serv. **97** (1949). — Zur Entwicklungsphysiologie der Mutante *Pearl* (*Pl*) von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **58**, 398—403 (1951a). — The position of the wings of killed *Drosophila*.

Dros. Inf. Serv. **25**, 136 (1951 b). — Veränderungen des Borstenmusters bei der Mutante *Pearl* von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **59**, 261—268 (1952). — ROSIN, S., u. W. NEF: Die Anwendung der Regressionsanalyse auf die Untersuchung der Bedeutung von Umweltfaktoren für die Manifestation einer Mutante von *Drosophila*. Statist. Vjschr. (im Druck). — SCHATZ, ELISABETH: Über die Formbildung der Flügel bei Hitzemodifikationen und Mutationen von *Drosophila melanogaster*. Biol. Zbl. **70**, 305—353 (1951). — SNEDECOR, G. W.: Statistical methods. Ames 1946. — STERN, C.: Genes and developmental patterns. Caryologia (Pisa) **6**, 355—369 (1954). — ZALOKAR, M.: Anatomie du thorax de *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **54**, 17—53 (1947).

Dr. WALTER NEF,

Zoologisches Institut, Bern (Schweiz), Sahlistr. 8

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

DIE CHROMOSOMENFORMEL DES *ALBICANS*-KOMPLEXES DER SIPPE GRADO VON *OENOTHERA SUAVEOLENS*

Von

WILFRIED STUBBE und LOTHAR DIERS

(Eingegangen am 31. Januar 1958)

Diese Mitteilung ist ein Nachtrag zu früher veröffentlichten cytogenetischen Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens* (STUBBE 1953). Aus den damals angegebenen Diakineseconfigurationen der Verbindungen von *albicans* Grado mit bekannten Komplexen (vgl. Tabelle 1, Spalte I) läßt sich für *albicans* Grado folgende Chromosomenformel ableiten:

$$1 \cdot 11 \quad 3 \cdot 6 \quad 5 \cdot 7 \quad 9 \cdot 4 \quad 10 \cdot 12 \quad 13 \cdot 8 \quad 2 \cdot 14.$$

Die Bekanntgabe unterblieb, weil diese Formel aus im folgenden zu besprechenden Gründen nur als vorläufige betrachtet wurde.

1. Nach dieser Formel muß das freie Paar in den Diakinesen von *albicans* Grado · *rubens* und *albicans* Grado · *gaudens* 9 · 4 heißen. Diesem Chromosom wurde von RENNER (1933/34, S. 245; 1942/43, S. 125) das *nanella*-Gen von *rubens* und *gaudens* zugeordnet. Zwar war die direkte Isolierung in 9 · 4 von *rubens* oder *gaudens* seinerzeit nicht möglich; es ließ sich jedoch zeigen, daß der *nanella*-Faktor, wenn er durch crossing-over auf *velans* übergeht, dann im 4-Ende des 3 · 4-Chromosoms liegen muß. Man sollte nun erwarten, daß der *nanella*-Faktor in 9 · 4 von *gaudens* zwischen *albicans* Grado und *gaudens* ausgetauscht wird, weil das 9 · 4-Chromosom nicht im 12er-Ring liegt, sondern im freien Paar. Die in jedem Jahr ausgeführte Selbstung von *albicans* Grado · *gaudens* brachte aber niemals die neben der Normalform zu erwartenden Zwerge. Die zusätzlich ausgeführte Kreuzung von *albicans* Grado · *gaudens* mit *Oe. Lamarckiana nanella* ergab folgende Typen: 32 *Lamarckiana nanella*, 49 (*N.*-)*albicans* · *gaudens*, 42 (*N.*-)*albicans* · *velans*, 2 (*N.*-)Abweicher, 44 taube Samen (die nach RENNER 1916 als *gaudens*-Homozygoten anzusehen sind). Es fehlten sowohl normalwüchsige *Lamarckiana* wie auch zwergige *albicans*-Verbindungen. Dieser Widerspruch zwischen der aufgestellten Formel und den züchterischen Ergebnisse konnte bis heute nicht aufgeklärt werden.

2. Um die Richtigkeit der obengenannten Formel auf cytologischem Wege nachzuprüfen, wurden in den letzten Jahren die Diakineseconfigurationen erneut untersucht und durch weitere ergänzt (Tabelle 1, Spalte II und III). Die früher mitgeteilten Daten ließen sich bestätigen; bei den neu analysierten Bastarden stimmen die Konfigurationen mit einer einzigen Ausnahme mit den nach obiger Formel berechneten überein. Diese Ausnahme ist die *subcurvans*-Verbindung von *albicans* Grado, welche nicht wie gefordert 6,8 sondern 4,10 ergibt (und zwar sowohl mit *subcurvans* von *Oe. parviflora* WALDENBURG wie mit *subcurvans* von *Oe. silesiaca*). Bedenken, die man gegen die Formel von *albicans* Grado aus dem

hier festzustellenden Widerspruch herleiten kann, lassen sich mit folgenden Argumenten entkräften:

1. Die Formel von *albicans* Grado wurde ohne Zuhilfenahme der Formel von *subcurvans* abgeleitet¹.

2. Die Ableitung der Formel basiert allein auf cytologischen Befunden, an deren Richtigkeit kaum noch zu zweifeln ist; denn die meisten der festgestellten Konfigurationen wurden mehrfach und unabhängig voneinander beobachtet.

Zwischen den Ergebnissen der Spalten I und III von Tabelle 1 liegt ein zeitlicher Abstand, der es notwendig machte, die Bastarde neu herzustellen. Irgendwelche Anhaltspunkte dafür, daß sich die Formeln der bekannten, hier verwendeten Komplexe im Laufe der Zeit verändert haben könnten (wie es z. B. CLELAND 1950, S. 73 für *acuens* berichtet hat), liegen nicht vor.

3. Im Gegensatz zu dem hier angewendeten Verfahren wurde die Formel für *subcurvans* entscheidend mit Hilfe züchterischer Befunde, z. T. aus verschiedenen Quellen stammend, in Verbindung mit relativ wenigen cytologischen Daten abgeleitet

Tabelle 1. *Diakinesekonfigurationen von albicans Grado-Verbindungen*

Partnerkomplexe	I STUBBE 1950—1953 (veröffentlicht)	II STUBBE 1953—1956	III DIERS 1957
<i>h</i> blandina	2, 12	—	2, 12
<i>curvans</i>	2, 12	2, 12	2, 12
<i>h</i> deserens	2, 12	2, 12	2, 12
<i>dilatans</i>	—	14	14
<i>elongans</i>	—	—	2, 12
<i>flavens</i> Standard . .	6, 8	—	6, 8
<i>flavens</i> Friedr.hagen	14	—	14
<i>flavens</i> Fünfkirchen .	14	—	14
<i>flavens</i> Grado . . .	14	—	14
<i>flectens</i>	2, 6, 6	—	2, 6, 6
<i>h</i> franciscana EM. . .	—	14	14
<i>gaudens</i>	2, 12	2, 12	2, 12
<i>M-gaudens</i>	—	2, 2, 10	—
<i>h</i> hookeri	14	14	14
<i>β-Iowa</i> II	—	—	14
<i>β-Iowa</i> VI	—	—	2, 2, 10
<i>percurvans</i>	—	14	14
<i>rubens</i>	2, 12	—	—
<i>subcurvans silesiaca</i> .	—	4, 10	4, 10
<i>subcurvans parvifl.</i> W.	—	4, 10	4, 10
<i>undans</i>	—	14	14
<i>velans</i>	14	—	14

(BAERECKE 1944, S. 74). Da auch bei der Aufstellung von *augens* auf züchterische Ergebnisse zurückgegriffen werden mußte (BAERECKE 1944, S. 78ff.), haftet den Formeln von *augens* und *subcurvans* eine gewisse Unsicherheit an. Auf Grund der in Tabelle 2 aufgeführten, aus der Literatur entnommenen Befunde, läßt sich jedoch die von BAERECKE aufgestellte Formel für *augens* auf rein cytologischer Basis bestätigen. Es bleibt deshalb nur noch die Vermutung, daß die Formel für *subcurvans* nicht stimmt. Diese wird auch dadurch gestützt, daß schon BAERECKE (1944, S. 80) für die Verbindung *augens* · *subcurvans* einen Widerspruch zwischen berechneter und beobachteter Konfiguration feststellen mußte. Hierauf nimmt auch RENNER (1956, S. 221) Bezug, wenn er feststellt, daß die Analyse der *Oe. parviflora* noch einmal von Grund auf in Angriff genommen werden müsse².

¹ Die ausführlich durchgeführte Ableitung ist in einer Staatsexamensarbeit für das Lehramt an höheren Schulen von L. DIERS niedergelegt und steht zur Einsicht zur Verfügung.

² Vor allem muß geprüft werden, ob die beiden *subcurvans*-Komplexe von *Oe. silesiaca* und *Oe. parviflora* wirklich in der Segmentanordnung übereinstimmen, wie früher angenommen wurde (BAERECKE 1944, S. 71).

Da wir für die Endenbezifferung der *Oenothera*-Chromosomen stets den cytologischen Befunden gegenüber den züchterischen den Vorrang zu geben haben, hielten wir es für gerechtfertigt, die oben angeführte Formel für *albicans* Grado

Tabelle 2. *Diakinesekonfigurationen von augens-Verbindungen*

Partnerkomplexe		Autoren
<i>h</i> blandina	2, 2, 2, 2, 6	BAERECKE 1944
<i>curvans</i>	14	BAERECKE 1944
<i>flavens</i> Friedr.hagen	2, 2, 2, 8	RENNER 1956
<i>flavens</i> Fünfkirchen .	2, 2, 10	RENNER 1956
<i>flavens</i> Standard . .	2, 12	RENNER 1956
<i>flectens</i>	4, 10	BAERECKE 1944
<i>h</i> hookeri	2, 2, 10	BAERECKE 1944
<i>percurvans</i>	2, 2, 4, 6	BAERECKE 1944
<i>undans</i>	4, 10	BAERECKE 1944
<i>velans</i>	2, 12	BAERECKE 1944

zu veröffentlichen, auch ohne daß die noch bestehenden, hier diskutierten Unklarheiten restlos beseitigt sind. Da der Komplex mit einer relativ großen Zahl andersartiger Genomkomplexe unter Ausbildung eines 14er-Ringes in der Diakinese vollendet komplexheterozygotische Bastarde liefert, ist er für züchterische Experimente zur Plastomanalyse besonders geeignet.

Das Ausgangsmaterial für die hier mitgeteilten Untersuchungen verdanken wir dem Entgegenkommen von Herrn Professor Dr. O. RENNER und Herrn Professor Dr. R. E. CLELAND. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung unserer Arbeit.

Literatur

BAERECKE, M.-L.: Zur Genetik und Cytologie von *Oenothera ammophila* FOCKE, *Bauri* BOEDIJN, *Beckeri* RENNER, *parviflora* L., *rubricaulis* KLEBAHN, *silesiaca* RENNER. Flora (Jena) **138**, 57 (1944). — CLELAND, R. E.: The Origin of *Neo-Acuens*. Studies in *Oenothera* Cytogenetics and Phylogeny. Indiana University Publications, Science Ser. No 16, 1950. — RENNER, O.: Die tauben Samen der Oenotheren. Ber. dtsh. bot. Ges. **34**, 858 (1916). — Zur Kenntnis der Letalfaktoren und des Koppelungswechsels der Oenotheren. Flora (Jena) **127**, 215 (1933/34). — Über das Crossing-over bei *Oenothera*. Flora (Jena) **136**, 117 (1942/43). — Europäische Wildarten von *Oenothera* III. Planta (Berl.) **47**, 219 (1956). — STUBBE, W.: Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 180 (1953).

Dr. WILFRIED STUBBE, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstraße 17

From Department of Zoology, Columbia University, New York, USA.

RANDOMNESS OF NUCLEAR DISTRIBUTION IN CONIDIA OF *NEUROSPORA* HETEROKARYONS*

By

DEANA T. KLEIN

(Eingegangen am 30. Januar 1958)

Introduction

In *Neurospora* the establishment of a heterokaryon may be accomplished by the fusion of hyphae of two strains, each homokaryotic for a different mutant nucleus. If the mutations involve nutritional deficiencies, the heterokaryon will grow on an unsupplemented medium for each mutant nucleus carries the normal allele of the other enabling the heterokaryon to be physiologically "wild type" or prototrophic.

It might be assumed, a priori, that the two types of mutant nuclei would become randomly distributed among the hyphae of the mycelium and also that the nuclei in the conidia would reflect the relative proportions of the two nuclear types in the culture. PROUT *et al.* (1953) have tested statistically the assumption that the conidial nuclei are distributed randomly. They found that only in one heterokaryon of the three tested were the data consistent with the assumption of random distribution; in the other two, there was evidence for non-randomness. They suggested that within the conidia the nuclei are correlated with respect to type: that is, like types of nuclei tend to occur together.

Similar experiments using another heterokaryon were reported by ATWOOD and MUKAI (1955) and their data were interpreted to indicate that nuclear distribution was frequently non-random. They found a deficiency of heterokaryotic colonies observed compared to that expected suggesting a type of non-randomness which could result from an association of like nuclei. There are, however, some inconsistencies in ATWOOD's data which will be discussed in detail later. It was felt that a more intensive investigation of randomness might resolve these problems.

In contrast to the reports summarized above, those data presented here indicate that there is random distributed of nuclei in the macroconidia with only infrequent departures from randomness. Reasons for the discrepancies are discussed.

Materials and Methods

The homokaryotic, macroconidial, mutant stocks of *Neurospora crassa* used were pantothenicless, (5531A); nicotinicless-2, albino-1, (4540A, 4637A); lysineless-3, (4545A), and 5-aminobenzoicless, (1633A). All cultures were grown at 25° C in 50 ml Erlenmeyer flasks on FRIES' synthetic medium supplemented with the appropriate growth factors (RYAN 1950).

* Supported in the part by a Public Health Service Research Fellowship from the National Cancer Institute, National Institutes of Health.

I wish to thank Dr. F. J. RYAN for his suggestions and for many interesting discussions concerning heterokaryosis. Also, thanks are extended to Dr. RICHARD M. KLEIN and Dr. EDWARD J. HEHRE for their suggestions concerning the manuscript.

Heterokaryons were constituted in two different ways: 1) Loopfuls of dry conidia of two mutants were spread together in a central position on minimal agar in Petri plates. 2) Conidia of the two mutants were each washed off the surface of the agar and filtered through glass wool. The two suspensions were combined to give various ratios of one type of conidia to the other. These suspensions were centrifuged and a loopful of the pellet placed on minimal medium in a Petri dish. The remainder of the procedure was as described below. Germination and growth proceeded for about 24 hours at 25° C, at which time hyphal tips were removed from the periphery of the colony and placed on minimal agar in test tubes. Conidia from each of those tubes where growth occurred were inoculated onto 10 ml minimal medium in 50 ml flasks and into a growth tube (RYAN 1950) ca. 300 mm long containing 10 ml minimal medium. After 7 days growth in the flasks the conidia were washed off the surface with 30 ml sterile distilled water and this suspension was filtered 3 times through sterile glass wool removing ca. 99% of the hyphal fragments. The suspension was diluted to a predetermined turbidity and plated in minimal agar medium containing 0.75% sorbose, 0.1% sucrose and the appropriate growth factors. Six plates per medium were used and the number of colonies was counted after 3 days at 25° C.

For each heterokaryon the average number of nuclei was determined by counting the nuclei in ca. 500 conidia, using in each case, the same conidial suspension as was plated. Conidia were stained for nuclear counts using a modification of the technique described by HUEBSCHMAN (1952). The optimal time and temperature for hydrolysis was 5 minutes at 60° in contrast to the time and temperature range employed by HUEBSCHMAN¹.

The data was subjected to statistical analyses employing both the iterative method described by PROUT *et al.* and the approximate method of ATWOOD and MUKAI.

Results and Discussion

Table 1 summarizes those data obtained by plating the conidia of hyphal tip isolates of the various heterokaryons. The values obtained for X-type nuclei (lysineless nuclei in 3 cases, pantothenicless nuclei in one case) as determined by the two statistical methods show a very close agreement which was seen also in ATWOOD's paper. Thus, for most determinations the simpler approximate method is quite satisfactory. Where χ^2 determinations are important the iterative method should be used².

These data (Table 1) clearly indicate the randomness of nuclear distribution regardless of the type of mutants constituting the heterokaryon. There is no evidence for non-random plating or differential mortality. Only one of the 18 χ^2_{pl} values is significant ($p \leq 0.01$) and this could happen by chance. Five of the 18 χ^2_{rd} values are significant but only one can be considered highly so.

The data of PROUT *et al.* and of ATWOOD and MUKAI show there to be a deficiency of heterokaryons observed compared to that expected. This is not the case with these data except where χ^2_{rd} shows any degree of significance. With one exception where χ^2_{rd} is significant, there is a deficiency of heterokaryotic colonies observed compared to the expected values under the random distribution hypothesis. This may be a causal relationship. PROUT *et al.* also suggested that a

¹ It is appropriate to mention here the typographical error in HUEBSCHMAN's paper which could account for failure. The sodium sulphate salt is listed (NaHSO_4) but it should read the sulphite form (NaHSO_3).

² χ^2_{tot} , with two degrees of freedom tests the combined hypotheses of no plating error and random distribution of nuclei. χ^2_{pl} and χ^2_{rd} each has one degree of freedom. χ^2_{pl} tests whether the plating procedure is carefully done and whether there are disturbing factors such as differential mortality of conidia. χ^2_{rd} is obtained by subtraction of χ^2_{pl} from χ^2_{tot} and tests the hypothesis of random distribution. If either chi-square is significant, the hypothesis is suspect.

Table 1. *Numbers of colonies found by plating conidia from heterokaryons in four different media and statistical treatment of the resulting data*

Heterokaryotic growth was established according to the first method described in the text. The input ratio of conidia was approximately 1:1. The average rate of growth of the isolates of heterokaryon A was 3.5 mm/hr; of B, 3.8; of C, 3.9; and of D, 3.7.

	Medium				Iterative method				Estimate of X-type nuclei: approximate $p \approx$
	minimal	+X	+Y	com- plete	Estimate of X-type nuclei: iterative $\hat{p}$	Chi square			
						χ^2_{tot}	χ^2_{pl}	χ^2_{rd}	
Heterokaryon A: Lysineless (X) + Pantothenicless (Y)									
Obs ¹	124	161	291	327	0.31	1.0	0.11	0.89	0.31
Exp rd	120.5	166.7	284.1	331.5					
Obs	99	129	208	245	0.34	1.2	0.07	1.13	0.35
Exp rd	93.8	133.4	207.5	246.8					
Obs	353	467	832	859	0.31	7.2 ²	3.03	4.17 ³	0.30
Exp rd	333.5	465.0	791.9	922.9					
Obs	166	303	434	603	0.36	14.4 ⁵	0.82	13.58 ⁵	0.35
Exp rd	212.5	308.0	455.0	545.1					
Heterokaryon B: Lysineless (X) + p-Aminobenzoicless (Y)									
Obs	86	122	156	204	0.38	2.2	0.03	2.17	0.33
Exp rd	81.6	118.8	164.8	203.2					
Obs	38	73	143	203	0.20	9.8 ³	1.37	8.43 ³	0.30
Exp rd	49.6	63.3	167.7	181.9					
Obs	77	126	178	249	0.37	3.6	0.77	2.83	0.38
Exp rd	89.4	130.7	186.3	226.3					
Obs	67	83	115	156	0.37	0.6	0.53	0.07	0.39
Exp rd	60.2	87.2	124.2	151.0					
Heterokaryon C: Lysineless (X) + Nicotinicless-albino (Y)									
Obs	73	137	219	212	0.35	8.2 ³	7.89 ⁴	0.31	0.36
Exp rd	89.0	128.5	193.7	233.6					
Obs	83	124	189	215	0.35	0.4	0.20	0.20	0.36
Exp rd	84.4	121.9	183.6	221.6					
Obs	121	184	240	269	0.40	1.4	0.80	0.60	0.40
Exp rd	118.3	177.0	230.2	289.8					
Obs	115	196	273	374	0.40	6.8 ²	0.42	6.38 ³	0.38
Exp rd	139.6	209.1	272.0	342.1					
Obs	118	163	275	315	0.32	1.0	0.03	0.97	0.33
Exp rd	117.0	163.9	271.5	318.9					
Heterokaryon D: Pantothenicless (X) + p-Aminobenzoicless (Y)									
Obs	96	148	215	278	0.35	2.2	0.012	2.19	0.37
Exp rd	108.8	149.2	220.0	260.7					
Obs	125	195	177	254	0.52	3.8	0.001	3.80	0.54
Exp rd	117.6	192.0	182.5	256.5					
Obs	125	203	274	314	0.38	3.0	1.69	1.30	0.39
Exp rd	138.9	195.1	263.6	319.9					
Obs	70	149	150	206	0.49	5.4	0.96	4.44 ²	0.49
Exp rd	90.8	142.0	146.2	197.7					
Obs	96	132	179	238	0.37	2.0	0.01	1.99	0.38
Exp rd	96.6	134.9	187.5	225.7					

¹ Obs: The number of colonies observed on the different agar media. Exp rd: The number of colonies expected on each type of medium on the basis of random distribution of nuclei.

² $P \leq 0.05$. ³ $P \leq 0.02$. ⁴ $P \leq 0.01$. ⁵ $P \leq 0.001$.

deficiency of heterokaryons as compared with that expected under random distribution might best account for significant χ^2_{rd} 's.

Table 2. *Numbers of colonies found by plating conidia from heterokaryons in four different media and statistical treatment of the resulting data*

The heterokaryon was established according to the second method described in the text with an input ratio of approximately 1:10 (lysineless:pantothenicless).

Medium					Iterative method				Estimate of X-type nuclei: approximate $p \approx$
	mini- mal	+X	+Y	com- plete	Estimate of X-type nuclei: iterative $\hat{p}$	Chi square			
						χ^2_{tot}	χ^2_{pl}	χ^2_{rd}	
Heterokaryon A: Lysineless (X) + Pantothenicless (Y)									
Obs ¹	11	No 1 original culture, 1.4 mm/hr				4.0	0.83	3.17	0.04
Exp rd	16.6	20	288	320	0.03				
		19.4	302.3	302.3					
Obs	26	No 1 first subculture, 3.2 mm/hr				0.45	0.40	0.05	0.09
Exp rd	32.1	43	320	319	0.06				
		38.5	319.5	326.5					
Obs	20	No 1 second subculture, 3.6 mm/hr				0.40	0.002	0.39	0.08
Exp rd	21.3	28	209	218	0.06				
		26.6	212.2	215.8					
Obs	23	No 2 original culture, 3.4 mm/hr				2.60	0.002	2.59	0.12
Exp rd	33.3	40	225	243	0.09				
		40.1	225.9	233.2					
Obs	16	No 2 first subculture, 3.6 mm/hr				0.40	0.35	0.05	0.10
Exp rd	16.1	20	116	130	0.08				
		19.7	121.6	124.8					

¹ Obs: The number of colonies observed on the different agar media. Exp rd: The number of colonies expected on each type of medium on the basis of random distribution of nuclei

PROUT *et al.* and ATWOOD and MUKAI suggested that this departure from randomness may operate during conidiation because there may be a tendency toward the formation of homokaryotic conidia. This hypothesis was tested in the following manner. A heterokaryon was established with an input ratio of lysineless : pantothenicless conidia of 1:10 (Table 2). Two hyphal tip isolates were used, one exhibiting an initially slow rate of growth (1.4 mm/hr), and the other, a wild type rate of growth (3.4 mm/hr). The relative proportions of homokaryotic conidia were found to be quite high when these two isolates were plated initially and the proportions remained high in subsequent subcultures. These conidial populations consist almost entirely of homokaryotic conidia because of the low proportion of lysineless nuclei. There was no significant difference between the number of heterokaryotic colonies observed and that expected. Although an experimental preponderance of one type of nucleus existed, the statistical data support the hypothesis of random distribution of nuclei in the conidia.

It is also of interest that although the growth rate of isolate No 1 (Table 2) after subculturing was approximately that of isolate No 2, the proportions of X-type nuclei (lysineless nuclei) did not increase relatively as much. This will be discussed in a subsequent paper.

In contrast to the reports of PROUT *et al.* and ATWOOD and MUKAI the data in this paper support the hypothesis of a random distribution of nuclei in macroconidia of *Neurospora* heterokaryons. In the work reported in this paper nuclear frequencies in conidia were determined for each heterokaryon whereas in PROUT's estimations of $\hat{p}$ only one heterokaryon was used to determine frequencies of

nuclear distribution. Since these frequencies are an important part of the equations which estimate $\hat{p}$ and χ^2_{tot} , it is reasonable to assume that small differences among nuclear frequencies of different heterokaryons might account for their results. There are several facts in the data of ATWOOD and MUKAI which indicate their failure to prove a non-random distribution of nuclei in spite of the authors' statement to the contrary. Where they used PROUT's iterative method to determine $\hat{p}$ and χ^2 , only 2 experiments out of 7 showed χ^2 to be significant and one of these was only barely so. Furthermore, only in these 2 experiments was there a deficiency of heterokaryotic colonies observed compared to the number expected. In the 5 other experiments there was no significant difference between the numbers observed and those expected. The conclusion of ATWOOD and MUKAI is clearly at variance with their data which tend to substantiate those reported in this paper to the effect that nuclear distribution is, in fact, random.

Summary

1. Random distribution of nuclei in the macroconidial populations of heterokaryons of *Neurospora crassa* has been shown.
2. Randomness is unaffected by either the genotype of mutants constituting the heterokaryon or by an increase in the relative proportions of homokaryotic conidia.
3. The estimates of nuclear frequency as determined by two different statistical methods were in very close agreement.

Zusammenfassung

1. Die Zufallsverteilung von Kernen in der Makrokonidien-Population der Heterokarya von *Neurospora crassa* wird gezeigt.
2. Der Grad der Zufallsverteilung ist sowohl durch die Genotypen der Mutanten, die das Heterokaryon bilden, als auch durch die Zunahme der relativen Menge von homokaryotischen Konidien nicht beeinflusst.
3. Die Verteilungsrate der beiden Kerntypen wurde mittels zweier verschiedener statistischer Methoden bestimmt; die Werte sind in sehr guter Übereinstimmung.

Literature

ATWOOD, K. C., and F. MUKAI: Nuclear distribution in conidia of *Neurospora* heterokaryons. *Genetics* **40**, 438—443 (1955). — HUEBSCHMAN, C.: A method for varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. *Mycologia* (N.Y.) **44**, 599—604 (1952). — PROUT, T., C. HUEBSCHMAN, H. LEVENE and F. J. RYAN: The proportions of nuclear types in *Neurospora* heterokaryons as determined by plating conidia. *Genetics* **38**, 518—529 (1953). — RYAN, F. J.: Selected methods of *Neurospora* genetics. *Meth. med. Res.* **3**, 51—75 (1950).

Dr DEANA T. KLEIN, Department of Microbiology, Albert Einstein College of Medicine,
Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., U.S.A.

Aus dem Imperial College Field Station, Sunninghill, Berks

FARBENPOLYMORPHISMUS BEI EINIGEN FELDHEUSCHRECKEN

Von

R. E. BLACKITH und MARGARET I. ROBERTS*

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. August 1957)

Einleitung

In der Behandlung von Wachstumsvorgängen mit der Gruppentheorie wurden neuerdings Fortschritte erzielt (JAFFARD 1956). Solche Methoden enthielten frühere Beschreibungen über den Form- und Größenwechsel der Organismen, waren von den Schwankungen der Kennzeichen des Bauplans abhängig und hauptsächlich qualitativ (WOODGER 1945).

Es besteht jedoch ein Bedarf an Methoden, die eine quantitative Beschreibung von Wachstum und Polymorphismus geben und welche besonders einer statistischen Bearbeitung zugänglich sind. Mit der Entwicklung der multivariablen Analyse ist uns eine Methode gegeben, mit der bei Orthopteren brauchbare Ergebnisse erzielt wurden (ALBRECHT und BLACKITH 1957).

Ihr Prinzip ist folgendes: Zwei stark voneinander abweichende Formen eines Organismus sind durch ein einziges Kennzeichen genügend zu unterscheiden. Zwei Merkmale erfordern die Konstruktion eines Diagrammes, welches dann diese allometrische Beziehung zwischen diesen beiden Größen aufzeigt. Wurden genügend viele Messungen an diesen beiden Formen vorgenommen, so ergeben die Daten 2 Ellipsoide, die sich überschneiden können. Solche Diagramme sind von COUSIN (1956) für die Untersuchungen an der Vererbbarkeit morphometrischer Formen bei Grylliden verwendet worden. Unterscheiden sich jedoch die beiden Formengruppen nur geringfügig voneinander, dann sind viele Kennzeichen nötig, um die Formverschiedenheit mit genügender Sicherheit zu beweisen. Mit 3 verschiedenen Merkmalen ergibt sich ein Raummodell, in welchem die Messungsergebnisse auf die 3 Achsen aufgetragen sind (Abb. 1). Für weitere Größen ist eine geometrische Darstellung nicht mehr möglich.

Die hier angewandte Methode beruht darauf, die Entfernung zwischen den Zentren von Ellipsoiden zu bestimmen, welche aus den Meßpunkten zusammengesetzt sind. Der Raum ist hierbei X-dimensional und abhängig von der Zahl X der gesuchten Größen. Bei der Berechnung müssen wir das Verhältnis zwischen jedem Größenpaar berücksichtigen sowie den Betrag der Überschneidung von 2 Ellipsoiden in einer beliebigen Dimension und schließlich noch die absolute Distanz zwischen den beiden Ellipsoidenzentren. Sind viele Kennzeichen gemessen worden, dann überschneiden sich die Ellipsoide der beiden Insekten-

* Wir danken Mr. M. J. R. HEALY vom Research Statistical Service, Rothamsted Experimental Station, für die elektronische Berechnung der Inversion der Streuungsmatrizen sowie Dr. W. LOHER für die Übersetzung dieser Arbeit.

gruppen nur wenig. Benutzt man orthogonale Achsen, so stellt die Entfernung zwischen den Ellipsoidenzentren nicht den „verallgemeinerten Abstand“ dar (RAO 1952; SCHMETTERER 1956). Um diesen zu erhalten, muß man schiefe Achsen verwenden, deren Cosinusse die Korrelationskoeffizienten zwischen den Merkmalspaaren sind. Dazu vergleiche man Abb. 1a und b, in denen dreidimensionale Diagramme mit rechtwinkligen und schiefen Achsen gezeigt werden.

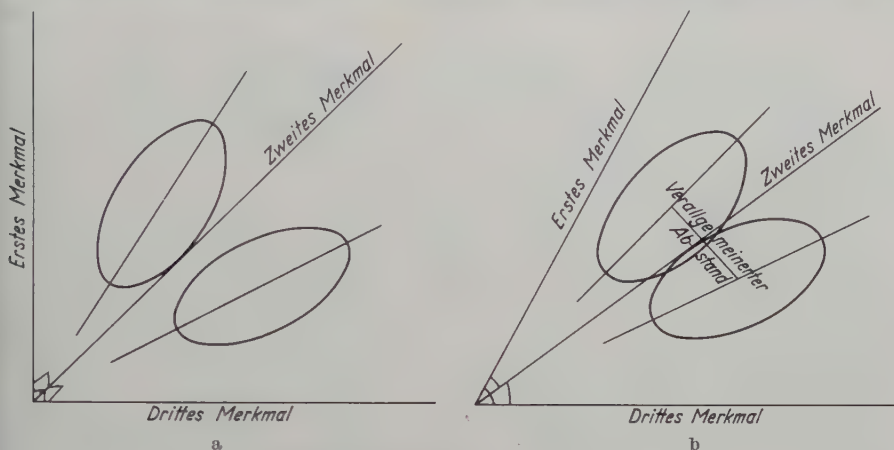


Abb. 1. a Raummodell; b Raummodell

Der erste Schritt ist die Aufstellung einer Streuungsmatrix für jede Organismengruppe. Sie besteht aus den Variablen und Covariablen für jedes der Merkmale, z. B.

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \dots \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \dots \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \dots \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \dots \end{pmatrix}$$

Glieder wie a_{ii} in der Hauptdiagonale sind die Variablen der Merkmale, a_{ij} die Covariablen. Die Varianz des ersten Merkmals ist a_{11} , a_{12} ist die Kovarianz des ersten und zweiten Merkmals. Die Matritzen für jede Gruppe werden dann eingesetzt. Man kann dann die umgekehrte Matrix mit Hilfe von verschiedenen Methoden berechnen, d. h. tatsächlich werden die Ansätze linearer simultaner Gleichungen gelöst, welche durch Gleichsetzen der Reihen der Streuungsmatrix mit denen der Einheitsmatrix entstanden sind. Beide sollen vom gleichen Grad sein, mit 1 als Hauptdiagonale und 0 an den übrigen Stellen. Dieser Vorgang schließt die Beziehungen zwischen den Merkmalen aus.

Für die inverse Matrix werden die Symbole c_{ii} und c_{ij} benutzt anstatt der ursprünglichen Zeichen. Jede ihrer Reihen wird dann mit dem Durchschnittwert der Differenzen jedes Merkmalpaares ($d_1, d_2, \dots$) multipliziert, und es ergeben sich daraus die aufeinanderfolgenden β -Koeffizienten:

$$\begin{aligned} \beta_1 &= c_{11}d_1 + c_{12}d_2 + c_{13}d_3 + c_{14}d_4 \dots \\ \beta_2 &= c_{21}d_1 + c_{22}d_2 + c_{23}d_3 + c_{24}d_4 \dots \\ \beta_3 &= c_{31}d_1 + c_{32}d_2 + c_{33}d_3 + c_{34}d_4 \dots \end{aligned}$$

Der verallgemeinerte Abstand (cf. Anhang), ist dann gegeben durch eine weitere Reihenummultiplikation:

$$D_2 = \beta_1 d_1 + \beta_2 d_2 + \beta_3 d_3 + \beta_4 d_4 + \dots$$

Diese β -Koeffizienten werden auch bei den Berechnungen der multiplen Regression benutzt, wenn die Differenzen ($d_1, d_2, \dots$) durch die Kovariablen der abhängigen und unabhängigen Faktoren ersetzt werden.

Die Konstruktion von Diagrammen „Verallgemeinerter Abstände“

Verallgemeinerte Abstände besitzen die wichtige Eigenschaft, Vektoren zu sein, die im vieldimensionalen Raum eine bestimmte Orientierung haben (FISHER 1938). Der verallgemeinerte Abstand gibt also genau an, wodurch und in welcher Richtung 2 Organismen voneinander getrennt sind.

In der Art *Stenobothrus lineatus* Panzer (Orthoptera, Acrididae) gibt es 2 Farbvarietäten: Die Heuschrecken sind entweder fast ausschließlich grün oder grün mit braunen Seiten und Beinen. Innerhalb jeder Gruppe tritt der gewöhnliche sexuelle Dimorphismus auf. Die andere untersuchte Akrididenart ist *Omocestus viridulus* L., bei der ebenfalls eine fast völlig grüne Spielform auftritt, während die Männchen der anderen größtenteils braun sind und die Weibchen grün mit braunen Seiten und Beinen. Zur Berechnung der verallgemeinerten Abstände zwischen jedem Formenpaar stellen wir ein Diagramm her, in welches wir jede dieser Distanzen maßgerecht auftragen. Wäre der Dimorphismus, welcher durch Geschlecht und Farbe bedingt ist, gleich, so verliefen alle die verallgemeinerten Abstände bestimmenden Vektoren parallel zueinander und das Diagramm würde sich auf eine einzige gerade Linie beschränken, auf der alle Gruppenpunkte lägen.

Sind die Farbverschiedenheiten jedoch nicht im Einklang mit der sexuellen Zweigestaltigkeit, dann sollten die Vektoren der verallgemeinerten Abstände für die Farbvarietät mehrweniger im rechten Winkel zu denjenigen Vektoren liegen, welche die beiden Geschlechter miteinander verbinden und ein zweidimensionales Diagramm wird entstehen.

Durch die Einführung einer anderen nah verwandten Heuschreckenart in die Analyse ergibt sich die Frage, ob die intraspezifischen und interspezifischen Formunterschiede unabhängig voneinander sind. Im bejahenden Falle verlaufen die verallgemeinerten Abstände, welche die Arten verbinden, im rechten Winkel zu der Fläche, in der die intraspezifischen Unterschiede liegen; das Ergebnis ist also ein dreidimensionales Netzwerk.

Im allgemeinen werden wir wenige grundsätzlich verschiedene Wachstumsvorgänge bei Insekten erwarten, da es anscheinend nur eine begrenzte Anzahl von Mechanismen — wahrscheinlich hormonal gesteuert — gibt, welche dazu dienen „to release, control, and direct the inherent capacity for growth and differentiation possessed by the cells of the various tissues“ (WIGGLESWORTH 1954). Eine solche Beschränkung läßt uns vermuten, daß anscheinend verschiedene Typen von Polymorphismen Ausdruck eines gemeinsamen Wachstumsmechanismus sind.

Ein Beispiel dafür bietet die Locustide *Nomadacris septemfasciata* SERV. (The Red Locust). Die morphometrischen Unterschiede zwischen Tieren, die eine verschiedene Anzahl von Häutungen durchlaufen haben (Augenstreifenpolymorphismus), sind identisch mit den Formunterschieden zwischen den Phasen

dieser Heuschrecken. Ein gemeinsamer hormonaler Mechanismus, der von der jeweiligen Verbreitungsdichte der Heuschrecken abhängt, mag für das Auftreten der beiden Formwechsel verantwortlich sein (BLACKITH und ALBRECHT 1957). Solche homologen Formwechsel, welche parallele verallgemeinerte Abstandsvektoren zeigen, nennt man symbasisch.

Es folgt die Analyse des Farbenpolymorphismus bei *Omocestus* und *Stenobothrus*: Je 10 morphometrische Merkmale wurden an 375 Imagines gemessen, die im Gelände des Imperial College Field Station gefangen wurden. Die gemessenen Teile und die Anzahl der Insekten in jeder Gruppe sind aufgezeigt in Tabelle 1. Die Antennensegmente wurden unter dem Mikroskop gezählt und eine daran befestigte Noniuseinteilung diente zum Messen der Komponenten des Pronotums sowie der Elytrenlänge, von der Spitze bis zur Brücke zwischen der ersten Analader und der dritten Axillarader an der Basis (RAGGE 1955).

Das Gewicht der Insekten ist ein wertvolles Merkmal für die morphometrische Analyse. Bei den Feldheuschreckenweibchen gibt es jedoch nennenswerte Schwankungen, die mit der sexuellen Reife einhergehen,

aber hauptsächlich die Abdomina betreffen. Diese werden daher abgeschnitten und Kopf und Thorax getrocknet und gewogen. Die übrigen Merkmale wurden mit einem Greifzirkel gemessen, der auf $\frac{1}{100}$ mm genau ist.

Man analysiert die Messungen direkt, ohne sie vorher in Logarithmen zu übertragen, denn es ergibt sich linear aufgetragen eine bessere, fast symmetrische Verteilung als im logarithmischen Maßstab (Abb. 2 und 3) (BLACKITH, VERDIER und ALBRECHT, in Vorbereitung).

Abb. 4 zeigt das Diagramm, in welchem alle verallgemeinerten Abstände zwischen den 8 Gruppen von Insekten eingetragen sind. Bezeichnenderweise ist es ein Flächen- und kein Raumdiagramm. Von dieser Flächenstruktur kann man ableiten, daß nicht mehr als 2 grundsätzlich verschiedene Typen von Polymorphismus vorhanden sind. Eine von ihnen ist offensichtlich der Sexualdimorphismus, da alle Männchengruppen auf der linken Seite des Diagramms zu

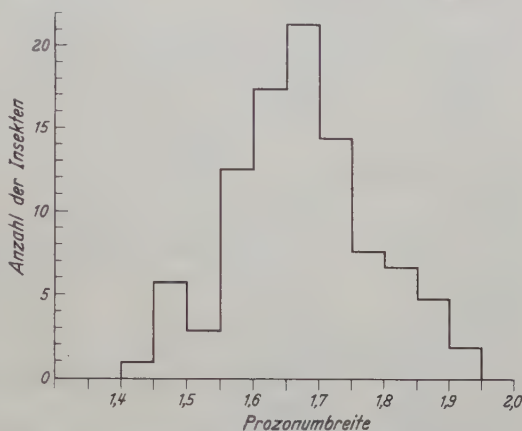


Abb. 2. Verteilung der Prozonumbreite (*Omocestus viridulus*: grünbraune Weibchen)

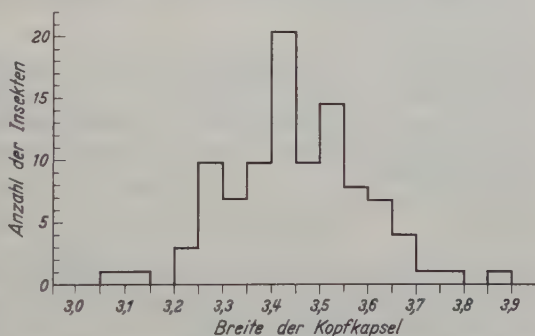


Abb. 3. Verteilung der Breite der Kopfkapsel (*Omocestus viridulus*: grünbraune Weibchen)

finden sind und alle Weibchengruppen auf der rechten. Man kann daraus schließen, daß die Formunterschiede zwischen den Arten virtuell unabhängig von der sexuellen Zweigestaltigkeit sind, denn *O. viridulus* ist von den *Stenobothrus*-

Tabelle 1

	Art							
	<i>Omocestus viridulus</i> L.				<i>Stenobothrus lineatus</i> (PANZER)			
Farbvarietät . . .	Braune	Grüne	Grünbraune	Grüne	Grünbraune	Grüne	Grünbraune	Grüne
Geschlecht	♂♂	♂♂	♀♀	♀♀	♂♂	♂♂	♀♀	♀♀
Anzahl der Insekten	100	36	100	32	39	8	42	18
Merkmale	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Anzahl der Antennensegmente .	23.4900	23.5000	23.5100	23.5625	23.8718	23.7500	24.0000	24.3889
Kopfbreite (mm) .	2.5271	2.5503	3.4499	3.4759	2.6185	2.6625	3.5695	3.6422
Mesothoraxbreite (mm) . .	2.3830	2.5136	3.2951	3.3178	2.5905	2.6463	3.4464	3.4989
Länge des Hinterfemurs (mm) .	9.8008	9.7206	12.3693	12.4222	9.7221	9.8738	12.1640	12.1606
Breite des Hinterfemurs (mm) .	2.0576	2.0442	2.5497	2.6056	2.2179	2.1700	2.7136	2.7406
Prozonumlänge des Pronotums (mm)	1.2955	1.3153	1.6500	1.6859	1.4064	1.4313	1.8048	1.8194
Metazonumlänge des Pronotums (mm) . . .	1.9360	1.8777	2.5400	2.4391	1.6949	1.7688	2.1857	2.2222
Breite des Vorderfemurs (mm) . .	0.5748	0.5517	0.6352	0.6334	0.5803	0.5938	0.6502	0.6472
Elytrenlänge (mm)	12.4450	12.3139	14.8560	14.6625	11.9154	12.4250	13.5619	13.8222
Trockengewicht ohne Abdomen (mg).	19.2410	18.3083	36.3260	37.5813	20.4103	20.8500	38.4524	39.0278

Gruppen getrennt und mit ihnen durch die verallgemeinerten Abstände verbunden. Sie verlaufen durchschnittlich im rechten Winkel zu denen, welche

die verschiedenen Geschlechter miteinander verknüpfen. Überdies sind die Unterschiede zwischen den Farbvarietäten symbasisch zu den Artunterschieden. Die Tabelle 1 zeigt sie in den individuellen morphometrischen Kennzeichen zwischen den Insektengruppen; die Tabelle 2 zeigt ihre verallgemeinerten Abstände.

Tabelle 2. Verallgemeinerte Abstände

Anzahl nach Tabelle 1	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I	0	2.0	9.0	9.1	3.6	3.5	10.5	11.1
II		0	8.5	8.5	2.5	2.2	9.6	10.3
III			0	1.2	8.8	8.1	4.6	4.7
IV				0	8.5	7.9	3.6	3.8
V					0	1.2	8.8	9.4
VI						0	8.4	9.0
VII							0	1.1
VIII								0

Bei *S. lineatus* neigt die grüne Form dazu, größer zu sein als die grünbraune. Acht Merkmale von 10 sind größer in grünen Weibchen und der Unterschied in der Kopfbreite ist signifikativ auf einer 5%-Ebene der Wahrscheinlichkeit. Bei den Männchen sind die grünen Individuen ebenfalls in 8 Merkmalen größer, aber nur die Elytrenlänge ist signifikativ die größere.

Der Fall von *Omocestus viridulus* ist schwieriger: Obwohl die grünen Exemplare der Weibchen in 7 Merkmalen größere Meßwerte haben als die grünbraunen, sind sie in Hinsicht auf das einzige Kennzeichen, welches einen signifikativen Unterschied aufweist, die kleineren: es ist die Länge des Metazonums am Pronotum. Die braunen Männchen haben auch größere Metazona als die grünen und die Breite des Vorderfemurs ist ebenfalls signifikativ größer für die braune Form. Die Pronotumbreite ist aber signifikativ größer in den grünen Männchen und zeigt somit, daß es eher die Gestalt als die Größe des Insekts ist, welche mit der Farbe

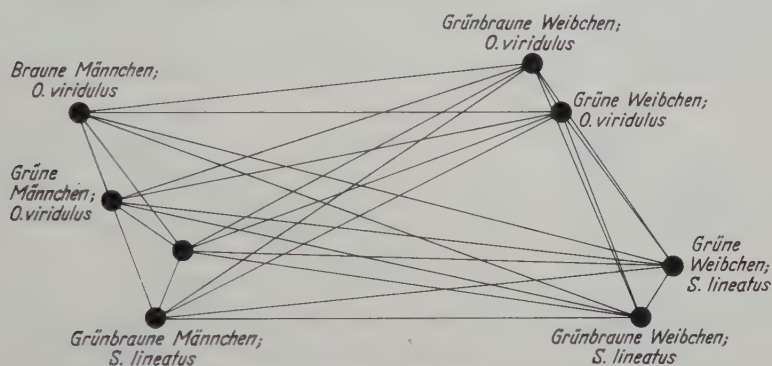


Abb. 4. Experimentelles zweidimensionales Diagramm (28 verallgemeinerte Abstände)

einhergeht. PETERSEN und TREHERNE (1949) fanden keinen signifikativen Unterschied zwischen diesen Farbformen hinsichtlich der Elytren- und (wahrscheinlich) der ganzen Pronotumlänge. (Das Geschlecht der gemessenen Tiere und die Art der Messungen sind nicht angegeben und wurden aus dem Zusammenhang der Arbeit von PETERSEN und TREHERNE abgeleitet.)

Diskussion

Diese Arbeit weist darauf hin, daß die Formunterschiede zwischen den Farbvarietäten dieser Feldheuschrecken die gleichen morphometrischen Wechsel aufzeigen wie sie damals stattfanden, als diese nahverwandten Genera im Laufe der Zeit gebildet wurden. Unter der Voraussetzung der genetischen Abhängigkeit der Farbpolymorphen zeigt auch das Diagramm der verallgemeinerten Abstände, daß die braunen Männchen und grünbraunen Weibchen von *O. viridulus* phenotypischer Ausdruck eines gemeinsamen Genotypus sind, der entsprechend dem Geschlecht des Insekts veränderlich ist. Die morphometrische Verwandtschaft dieser teilweise oder ganz braunen Formen zu den grünen desselben Geschlechts ist ausgedrückt im Diagramm durch die gleiche Richtung.

Die Annahme einer solchen Hypothese bereitet jedoch Schwierigkeiten, wenn man sie wie RUBTZOZ (1935) mit der Anwendung der Vavilovschen Regel verbindet. Diese Regel besagt in unserem Falle, daß die grünen Individuen einer Art morphometrisch der grünen Form einer nahverwandten eher ähneln als irgendeiner anderen Farbvarietät der gleichen Art. Einander ähnliche Gruppen sind jedoch hinsichtlich der gemessenen Merkmale durch kürzere verallgemeinerte Abstände voneinander getrennt als stärker verschiedene Gruppen. Eine solche Darstellung ist geometrisch unvereinbar mit dem zweidimensionalen Diagramm, das

experimentell in dieser Arbeit gefunden wurde. Die Anwendung der Vavilovschen Regel ist also nachweislich für Akrididen nicht zulässig.

Wenn die Regel gültig sein soll, dann muß die Dimension, in welcher der artenverbindende Vektor liegt, im mehrweniger rechten Winkel zu jenem verlaufen, welcher die Farbvarietäten miteinander verknüpft (vgl. Abb. 4 und 5). Nur auf diese Weise können die Insektengruppen gleicher Farbe auf dem Diagramm zusammengebracht werden, es sei denn, daß der Unterschied in der Form zwischen den Arten klein ist im Verhältnis zu dem in der Farbe. In Wirklichkeit sind aber der artspezifische und der Farbenunterschied von der gleichen Größenordnung, und obwohl die grünen Formen auf dem Diagramm nahe beieinanderliegen, finden sich die braunen weit auseinander.

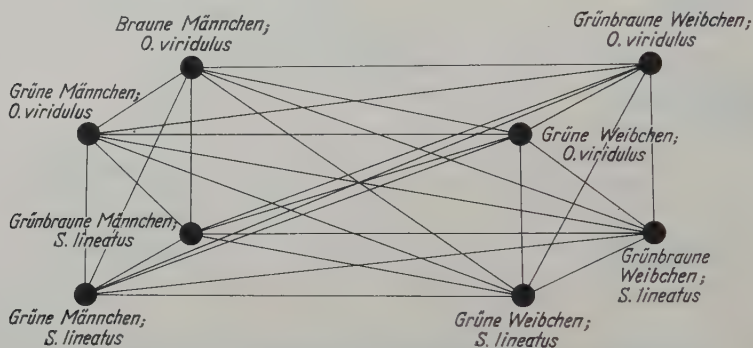


Abb. 5. Idealisiertes dreidimensionales Diagramm nach der Vavilovschen Regel

RUBTZOV (1935) sagte, die grüne Form von *Chorthippus albomarginatus* DE GEER sei größer als die anderen Farbvarietäten dieser Art, eine Feststellung, die von PETERSEN und TREHERNE (1949) falsch zitiert wurde. Der Unterschied in den Farbvarietäten ist jedoch mehr in der Form als in der Größe begründet und diese Vermutung wird durch unveröffentlichte Daten an *Chorthippus parallelus* (ZETT.) gestützt. Es tritt jedoch eine Verschiebung der grünen Formen gegen diejenige Seite des Diagrammes auf, in welcher die Weibchen aufgetragen sind. Das zeigt die Neigung der grünen Individuen dieser Art, ein wenig größer zu sein. Es scheint keine allgemeine Beziehung zwischen Farbe und Form bei diesen Akridiern zu bestehen. Selbst wenn beide Faktoren nachweislich genetisch kontrolliert sind, kann man diese Vererbung nicht durch die Vavilovsche Regel voraussagen. Die damit verbundene Folge einer genetischen Kontrolle und die Unerwünschtheit lateinischer Namen für Farbvarietäten wurde von RICHARDS und WALOFF (1954) festgestellt.

Das Problem des differenzierten Ansprechens der Farbvarietäten auf Erhöhung der Populationsdichte, welches RUBTZOVs Hauptziel war, bleibt somit einer weiteren Untersuchung vorbehalten.

Zusammenfassung

1. Die Grundlagen einer Untersuchung über den Farbenpolymorphismus bei Heuschrecken wurden erörtert sowie die hierbei erfolgte Anwendung der multi-variablen Analyse.

Anzahl der Antennen-segmente	Kopfbreite	Mesothorax-breite	Länge des Hinterfemurs	Breite des Hinterfemurs	Prozonum-länge des Pronotums	Metazonum-länge des Pronotums	Breite des Vorderfemurs	Elytren-länge	Trocken-gewicht ohne Abdomen
Anzahl der Antennen-segmente	0.553,112								
Kopfbreite	0.023,752	0.022,725	0.108,150	0.020,252	0.012,145	0.017,982	0.002,332	0.077,208	0.794,576
Mesothorax-breite	0.013,786	0.011,353 0.014,966	0.038,919 0.035,204	0.008,672 0.007,959	0.005,865 0.005,239	0.008,036 0.007,299	0.001,754 0.001,826	0.031,813 0.027,942	0.337,110 0.309,070
Hinterfemur (Länge)			0.254,456	0.036,151	0.014,239	0.034,127	0.006,956	0.178,937	1.447,390
Hinterfemur (Breite)				0.019,775	0.004,356	0.004,845	0.001,986	0.030,909	0.367,091
Prozonumlänge					0.009,744	0.004,244	0.000,761	0.012,413	0.173,679
Metazonum-länge						0.019,693	0.000,992	0.033,882	0.233,612
Vorderfemur (Breite)							0.001,464	0.008,028	0.071,871
Elytrenlänge								0.415,498	1.303,923
Trockengewicht									15.772,500

Inverse Matrix

2.0167	-0.7459 279,1270	0.8333 -124,5780 186,4690	-0.5053 -9,4488 -1,8503 10,5367	-0.1383 -9,5020 -2,2590 -1,8187 91,0340	-0.5522 -44,7450 -7,9030 6,3375 -2,3880 146,1020	-0.0483 -19,4720 -6,6350 -5,2411 7,0670 -10,8340 74,0550	2.8732 -6,1020 -47,2560 1,6968 -14,5500 11,0760 15,1940 917,5780	0.0175 -0,0636 1,1242 -1,5955 0,0777 0,8007 -2,3780 -6,8321 3,7125	-0,0274 -1,5847 -0,4193 -0,5289 -1,7160 -0,9516 0,0149 -2,8687 -0,1263 0,2291
--------	---------------------	---------------------------------	--	---	---	--	---	--	--

Da die Inversion einer 10×10 Matrix eine sehr lange Berechnung erfordert, wird das ausgearbeitete Beispiel einer kleineren 4×4 Matrix angeführt. Die dafür benutzte Methode ist jedoch allgemein gültig und für jede symmetrische Matrix verwendbar.

Ausgearbeitetes Beispiel der Inversion einer achsensymmetrischen Matrix

Reihe	Streuungsmatrix			Einheitsmatrix		
01	0.042,790	0.388,726	0.171,546	1	0	0
02		6.178,266	1.973,931		1	0
03			1.223,303			0
04						1

Schreibe Reihe 01 noch einmal als Reihe 11.

Dividiere die Reihe 11 durch den Hauptkoeffizienten (0.042,790).

Multipliziere die Reihe 11 mit dem auf den Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 12 (9.084,506).

Subtrahiere ebenfalls die Reihe 21 von der Reihe 02.

Dividiere die Reihe 22 durch den Hauptkoeffizienten (2.646,882).

Multipliziere die Reihe 11 mit den 2 Stellen hinter dem Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 12 (4.009,021).

Multipliziere die Reihe 22 mit dem auf den Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 23 (0.156,985).

Subtrahiere die beiden Reihen 31 und 32 Glied für Glied von der Reihe 03.

Dividiere die einzelnen Glieder der Reihe 33 durch den Hauptkoeffizienten (0.470,341).

Multipliziere die Reihe 11 mit dem 3 Stellen hinter dem Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 12 (1.099,416).

Multipliziere die Reihe 22 mit dem 2 Stellen hinter dem Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 23 (0.017,397).

Multipliziere die Reihe 33 mit dem auf den Hauptkoeffizienten folgenden Glied der Reihe 34 (0.018,136).

Subtrahiere die 3 Reihen 41, 42 und 43 Glied für Glied von Reihe 04.

Dividiere die einzelnen Glieder der Reihe 44 durch den Hauptkoeffizienten (0.049,772).

11	0.042,790	0.388,726	0.171,546	9.047,044	1	0	0
12	1	9.084,506	4.009,021	1.099,416	23.369,946	0	0
21	0.388,726	3.531,584	1.558,411	0.427,372	9.084,506	0	0
22	0	2.646,882	0.415,520	0.046,048	-9.084,506	1	0
23		1	0.156,985	0.017,397	-3.432,154	0.377,803	0
31		1.558,411	0.687,732	0.188,600	4.009,021	0	0
32		0.415,521	0.065,230	0.007,229	-1.426,131	0.136,985	0
33		0	0.470,341	-0.008,530	-2.582,890	-0.156,985	0
34			1	-0.018,136	-5.491,526	-0.333,768	1
41			0.188,600	0.051,721	1.099,416	2.126,117	0
42			0.007,229	0.000,801	-0.158,043	0.017,397	0
43			-0.008,530	0.000,154,7	0.046,843	0.002,847	0
44			0	0.049,772	-0.188,216	-0.020,244	0.018,136
45			1		-19.854,858	-0.406,735	0.364,382

20.091,618

Diskriminatorische Funktionskoeffizienten

$$\begin{aligned}\beta_1 &= 5.232,482 \\ \beta_2 &= 0.186,886 \\ \beta_3 &= 1.003,150 \\ \beta_4 &= 4.334,372\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}D^2 &= 1.847,867 \\ D &= 1.3372\end{aligned}$$

Inversionsmatrix

$$\begin{array}{r}88,354,264 \\ -2,168,123 \\ -2,168,155 \\ -5,851,613 \\ -19,854,886 \\ -2,168,123 \\ -0,438,437 \\ -0,341,145 \\ -0,406,736 \\ -5,851,614 \\ -0,341,145 \\ 2,132,725 \\ 0,364,382 \\ -19,854,858 \\ -0,406,735 \\ 0,364,382 \\ 20,091,618\end{array}$$

Kontrollen:

Erste Reihe der Inversionsmatrix X Reihe 01 = 1.000,000,260

Letzte Reihe der Inversionsmatrix X Reihe 04 = 1.000,005,283

2. Diagramme von verallgemeinerten Abständen wurden konstruiert, in welche die Polymorphen entsprechend ihrer ähnlichen morphometrischen Kennzeichen eingetragen werden können.

3. Mit Hilfe solcher Diagramme wird eine Analyse von fundamental verschiedenen Wachstumsvorgängen durchgeführt; sie wurden im Falle des Formwechsels der beiden Feldheuschreckenarten *Omocestus viridulus* und *Stenobothrus lineatus* angewendet.

4. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die braunen Männchen und die grünbraunen Weibchen von *Omocestus viridulus* phänotypische Varietäten eines gemeinsamen Genotypus sind.

5. Die Formunterschiede bei den Farbvarietäten dieser Arten können nicht nach der Vavilovschen Regel klassifiziert werden.

Literatur

ALBRECHT, F. O., and R. E. BLACKITH: Phase and moulting polymorphism in locusts. *Evolution* (N.Y.) **2**, 166—177 (1957). — BLACKITH, R. E., and F. O. ALBRECHT: Morphometric differences between the eyestripe polymorphs of the red locust. *Sci. J. R. Coll. Sci. (Lond.)* **27** (1957). — BLACKITH, R. E., M. VERDIER et F. O. ALBRECHT: Quelques nouvelles techniques utilisable en analyse morphométriques. (In Vorbereitung.) — COUSIN, G.: Biométrie et définitions de morphologie quantitative des espèces et de leurs hybrides. *Bull. Soc. zool. France* **81**, 247—289 (1956). — FISHER, R. A.: The statistical utilisation of multiple measurements. *Ann. Eugen. (Lond.)* **8**, 376—386 (1938). — JAFFARD, M. P.: Un problème sur les ensembles lié à la théorie de la croissance. *Bull. Sci. Math.* **80**, 100—108 (1956). — PETERSEN, B., and J. E. TREHERNE: On the distribution of colour forms in Scandinavian *Omocestus viridulus* L. *Oikos* (Copenh.) **1**, 175—183 (1949). — RAGGE, D. R.: The wing venation of the Orthoptera Saltatoria. *British Museum (Natural History) London*, 1955, 159pp. — RAO, C. R.: Advanced statistical methods in biometric research, 390 S. New York: John Wiley & Sons 1952. — RICHARDS, O. W., and N. WALOFF: Studies on the biology and population dynamics of British grasshoppers. *Anti-Locust Bull. (Lond.)* 1954, No 17. 182. — RUBTZOVA, I. A.: Phase variation in non-swarming grasshoppers. *Bull. ent. Res.* **26**, 499—524 (1935). — SCHMETTERER, L.: Einführung in die mathematische Statistik, 405 S., Wien: Springer 1956. — WIGGLESWORTH, V. B.: The physiology of insect metamorphosis, 152 S. Cambridge: University Press 1954. — WOODGER, J. H.: On biological transformations. In *Growth and Form*, p. 94—120, edit. LE GROS CLARK and P. B. MEDAWAR. Oxford: University Press 1945.

Dr. R. E. BLACKITH, MARGARET I. ROBERTS,
Imperial College Field Station, Sunninghill, Berkshire, England

INBREEDING EFFECTS IN RYE*

By

J. SYBENGA

With 3 Figures in the Text

(Eingegangen am 31. Januar 1958)

A. Introduction

For the study of the effects of inbreeding both on macromorphological and cytological characters, rye, *Secale cereale*, has been found a very useful experimental plant. Rye is naturally cross breeding, is rather easily grown and has few ($2n=14$) and rather large chromosomes. The high self sterility is a disadvantage in early generations; later selffertility is usually attained as a result of unavoidable selection.

Mainly two methods have been used for the study of the inbreeding process in rye:

1. Using population plants as starting material (MÜNTZING et al.).
2. Using F_1 plants from crosses between homozygous lines as starting material (REES et al.).

The advantage of the first method is the naturalness of the material, as selection has not occurred during previous inbreeding and thus no genes for extreme characters from the population have been lost. Furthermore homozygous lines and the crossing between these are not required.

The advantages of the latter method are: suitability for thorough statistical analysis as sufficient numbers of plants of parents, F_1 , F_2 , etc. can be grown simultaneously for several years; sufficient selffertility warranting sufficient offspring and continuity; acquaintance with the genetic constitution of the parents; absence of segregating recessive lethals.

The present study has been conducted on a material derived from population plants, and thus lacks the opportunity for thorough statistical analysis but is more natural than one derived from artificial crosses. More than by MÜNTZING and AKDIK (1948) have macromorphological characters been compared with cytological characters. At the same time the inbreeding could be followed over a longer period.

B. Material

The material consists of two groups of inbreeding families, each family consisting of one population plant of Petkus rye and its progeny after selfing over several generations. Observations have been made including S_6 though S_6 – S_5 will be considered here mainly, as considerable elimination of inbreeding lines occurred in S_6 and S_7 due to heavy frost in the winter of 1955–1956.

Group I was started in 1949 by selfing 100 population plants, 45 of which gave progeny in 1950. Group II was started in 1950 by selfing 64 population plants, 30 of which gave progeny in 1951.

* This study was started by Prof. Dr. R. PRAKKEN and handed over to the present author in 1955. Prof. PRAKKEN's valuable advice is gratefully acknowledged.

Elimination of plants and even of families continued as a result of low seed set and extreme weakness of some plants. Incomplete families (of which no observations were available in one or more of the six generations) and also plants not forming a part of a continuous line of inbreeding, were excluded. Mainly families of which only few generations could be maintained were excluded. This procedure was necessary to make later generations as comparable to the preceding generations as possible. The result is doubtless a selection for self-fertility and perhaps also slightly for vigour. Thus group I was reduced to 10 families sufficiently complete for study; group II to 6 families. The different families are rather different in size and structure as splitting up into sub families has occurred somewhat irregularly in different families and generations.

Table 1 gives the number of plants used for the computation of the averages for the cytological characters, pollen fertility and seedset for each generation and two examples of the same data for families. The cytological data in S_3 and S_4 for group I and S_3 for group II are lacking and thus both S_3 and S_4 are omitted for these data.

The macromorphological characters could be measured on a larger scale: sister plants to those taken for the cytological data, pollen fertility and seedset were used. For these the same numbers of plants are given in Table 1a.

All plants used for calculation of the averages originate from plants entered into the average of the previous generation. Not all plants entered into an average need have progeny, however. This is a reason later generations may contain less plants than earlier ones.

Correction for differences between years might be possible only to a slight extent by the use of two groups of inbreeding families: group I started in 1949, group II in 1950. Since both groups originate from the same population, differences between groups may be an indication of differences between years.

C. Methods

All observations have been made on air dry or on fixed material. The cytological observations were made on paraffin sections of florets prefixed in Carnoy 1:3 and stored in KARPECHENKO's chrome acetic formalin. All staining was done in gentian or chrysal violet. Pollen fertility was scored in Belling carmine glycerin preparations.

The observations concern a number of different, more or less quantitative characters¹ with the purpose to make possible a comparison between these characters as to their reaction on inbreeding. All different observations have therefore always been made on the same plants; the macromorphological ones have been made also on an additional number of sister plants, as mentioned above.

¹ Various other characters, showing a more clear mendelian segregation and usually studied on the living plants, will be discussed in a later publication.

Table 1. *Numbers of plants studied per generation for both groups of inbreeding families and the same for two families, one from each group. Cytological data, pollen fertility and seedset*

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
Group I	10	36	53	21*	29*	49
Group II	6	24	26	12*	20	17
Total	16	60	79	33*	49*	66
Family 117-14	1	1	2	1*	2*	4
Family 277-6	1	4	4	3*	6	4

* No cytological data available.

Table 1a. *As Table 1. Macromorphological data*

	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
Group I	58	117	161	229	202
Group II	44	109	88	67	127
Total	102	226	249	296	329
Family 117-14	1	5	13	5	13
Family 277-6	5	14	23	22	35

The following characters have been measured:

1. *Plant height*, determined as the average of the lengths of the three tallest stems, excluding the ear.

2. *Stem diameter*, the average diameter of the same three stems used for 1., measured just below the head. This gives a less variable and easier measured diameter than those measured at other places on the stem, although correlation with such other diameters need not be complete.

3. *Number of tillers* per plant. Both total number and number of tillers reaching more than $\frac{1}{2}$ of the length of the largest one.

4. *Dry weight* per plant including roots, in grams.

5. *Seed set* after selfing (bagging) on 1-4 heads per plant.

6. *Seed set* after open pollination.

For both 5. and 6. the estimation of seed set in % has been performed only in later generations. In order to obtain comparable values for all generations the plants have been assigned to four classes according to the estimated number of grains per head.

Class 1: less than 1 grain/head (sterile). Class 2: 1-10 seeds per head. Class 3: 11-50 seeds per head. Class 4: more than 50 seeds per head.

This classification is based mainly on the change from self sterility (class 1) to several degrees of self fertility (classes 2-4) during inbreeding, but nevertheless arbitrary. In comparing these characters with other characters this should be kept in mind.

7. % *Fertile pollen* as estimated from 200 grains per plant, using Bellings carmine-glycerin method.

8. *Chiasma frequency*. (Cf. p. 341.)

9. *Bivalent length*. (Cf. p. 342.)

Statistical analysis has been severely hampered by the composition of the material. No overall analysis was possible, often non-parametric methods were required. Some *t*-tests were performed, some correlations and rank correlations, and one analysis of variance calculated.

For the construction of the inbreeding curves the observed values have been combined into generation-averages per family and these into one average per generation.

Because of differences in structure between families weights had to be assigned to the family averages. These weights have been calculated as the *square root* of the number of plants in these averages. Usually variance is taken into account in the calculation of weights, but this was not possible in the present study, as variance is not only caused by sampling error and undefined errors, but also to great extent by segregation. Taking variances into the weights would mean an underweighting of the most strongly segregating families. Moreover the field plans could not be designed in a way permitting the calculation of reliable between-plant-variances.

Using the number of plants per family per generation as weight, which is the same as taking the overall averages directly from the plant values is not permitted as the starting plants are not genetically identical. It would result in an overestimating of the largest families.

No weighting would mean an overestimating of the reliability of single plant data.

The exact determination of the weights of the family means should also take into account the structure of the family in all preceding generations. Precise weighting, however, is usually not necessary as slight changes in weights have only very small effects on the average. The square root of the number of plants seemed a good compromise.

It was usually necessary to calculate the family averages in a similar way from averages of a lower rank.

Before giving the results some consideration will be given to characters 8. and 9.

Chiasma frequency is determined usually as the number of chiasmata that can be distinguished in metaphase I, as earlier stages are often less clear. The frequency can be expressed per cell or per bivalent. In rye this has been done by e.g. MATHER and LAMM (1935), LAMM (1936), REES et al. (1955 etc.). Other authors, however, used the number of bound chromosome arms per bivalent or per cell as a representative of chiasma frequency; in rye: PRAKKEN (1943), MÜNTZING and AKDIK (1948). It is then assumed that the number of bound chromosome arms is a simple function of the chiasma frequency. This is not so when chiasma localisation occurs, in which case the relation is more complicated. Nevertheless the latter method is the most useful where, as in rye, 1. the number of chiasmata per arm is low; 2. the exact number of chiasmata is not easily determined in many plants, especially in strongly contracted bivalents and with strong terminalisation; 3. terminalisation, fusion and loss of chiasmata are common and different in different plants.

Because of 3. it is even probable that in rye the number of chiasmata counted is as well merely a function of the number of chiasmata present originally as is the number of bound chromosome arms. The latter may even be a more reliable measure of chiasma frequency as it permits the observation of a much larger number of bivalents and cells. In this study the number of bound chromosome arms was used as an estimate of chiasma frequency.

In order to get an impression of the correlation between the number of chiasmata counted and the number of bound chromosome arms, the correlation coefficient was calculated and found to be 0.987 between both values *as averages*, in 16 plants taken at random, of 100 cells per plant.

The interpretation of calculated correlation coefficients between number of chiasmata and number of bound chromosome arms *per cell* presents serious difficulties.

In the first place the regression, which is approximately linear at low and medium values, tends to approach 0 asymptotically at high values. Secondly the distribution of the cell values of both characters is very skew, again especially at high values per plant. Yet correlation coefficients have been calculated in 20 cells of each of 8 plants taken at random. All correlations are significant (Table 2), all but one highly so. The strong tendency of the correlation coefficients to become smaller at higher values of mean chiasma frequency may not be caused by the factors mentioned above only. It may be caused also by:

1. the fact that at high values the counts of chiasmata become less reliable, as mentioned earlier (p. 341); 2. non-random distribution of the chiasmata, caused by interference and certain types of localization.

A further difficulty in the estimation of the chiasma frequency and of the number of bound chromosome arms in rye is the decrease of the number of chiasmata and bound chromosome arms with progress of meiosis including metaphase. This can cause considerable variation in the estimation of chiasma

frequency. The problem will be given more consideration in Sect. D III.

Table 2. *Correlation between chiasmata counted in MI and number of bound chromosome arms. 20 cells/plant. Eight plants, taken at random*

Chiasmata per cell	Bound arms per cell	Correlation coefficient
15.15	13.70	0.61
14.75	13.10	0.77
14.45	13.65	0.77
14.25	12.45	0.48
12.75	12.20	0.91
11.75	11.15	0.89
11.45	11.00	0.94
2.10	2.10	1.00

The measurement of bivalent length in MI has not been performed on all 7 bivalents per cell. Since it is usually impossible to recognize the individual bivalents in rye it would have been better to measure the whole complement. This, however, would involve a large amount of work with not very much value.

The length of the bivalents in MI depends on too many factors viz., besides on spiralization also on terminalization and localization of chiasmata and on

chiasma frequency: the more chiasmata, the more, shorter, ring bivalents. As representative measure one ring was chosen, as in almost all cells ring bivalents occur but not always rod bivalents. Moreover, rings are usually stretched less than rods. The shortest but one ring was chosen as it was sufficiently easily recognized and more approaching the average ring length than e.g. the shortest ring. Some other ring could have been used as well. One value for bivalent length was obtained for each cell for which also the number of bound chromosome arms was determined. Thus the value per plant is again the average of 50 measurements.

D. Results

I. Inbreeding curves

The bulk of the data has been condensed into Fig. 1. On the abscissa the six generations of inbreeding have been set out, on the ordinate the means of all measurements for each character per generation, expressed as per cent of the mean S_0 value. Table 3 gives the absolute values.

The shape of the curves appears not always to be quite regular. The leveling off seems not yet to have occurred even at S_5 . Those families, however, which could be studied in later generations also, did not show an observable change beyond the S_5 value. So it may be assumed that at S_5 the inbreeding minimum respectively maximum has been approached. It is clear that the different characters react differently on inbreeding as to minimum and speed of inbreeding. Most characters exhibit a clear inbreeding effect in their means, some do not. It was not found possible to estimate the significance of the deviation of the curves from any theoretical curves, due to the composition of the material.

In order to get an impression of the degree to which the inbreeding effect is consistent over the generations studied, rank correlations were calculated, and

denoted below by r , between generations (ranked according to their means) and a series of increasing numbers: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Thus $r = +1$ and $r = -1$ indicate complete consistency, $r = 0$ indicates complete absence of consistency.

Seedset after selfing (Fig. 1: *ss*) appears to increase only after S_1 , but then very rapidly percentagewise, partly an effect of selection for selffertility, which is completed in S_3 ($r = +0.8$). In absolute value (Table 3) this seedset only approaches *seedset after free pollination* (Fig. 1: *sf*), which shows a reasonably consistent ($r = -0.65$), though irregular and rather slight decrease, apparently strongly influenced by external factors.

Percent fertile pollen (Fig. 1: *fp*) shows the strongest and also a consistent ($r = -1.0$) inbreeding effect, apparently the resultant of a number of factors, one of which is decrease in chromosome pairing in meiosis. Inbreeding seems to be more deleterious to pollen than to ovule fertility. One of the causes for this may be a certain, involuntary, selection for seedset during inbreeding.

Number of bound chromosome arms (Fig. 1: *b*) per cell at meiosis decreases at a similar rate as seedset (free pollination), though much more regularly ($r = -1.0$). This decrease is in accordance with the observations of MÜNTZING c. s. and REES c. s. MÜNTZING and AKDIK (1948) found a positive correlation within generations between chiasma frequency and plant vigour, measured as plant height. In the present study a similar correlation was found, particularly in the first inbred generations. Similarly a correlation between chiasma frequency and pollen fertility was found, as also mentioned by MÜNTZING and AKDIK l. c.

Bivalent length (Fig. 1: *lb*) increases with inbreeding although somewhat irregularly, not quite consistently ($r = +0.65$) and only very slightly. Plants with long bivalents do not as a rule have less bound chromosome arms as is sometimes supposed. The correlation coefficient calculated for bivalent length and number of bound chromosome arms in 20 plants taken at random from the entire material (averages of 50 cells) was $r = -0.085$. A slight negative correlation might be attributed to the contrasted change during inbreeding.

This absence of correlation is in agreement with the observations of LAMM (1935) and PRAKKEN (1943). REES (1955) found in some cells in some anthers of rye a low number of chiasmata correlated with increased length of bivalents. Some lines in the present material have also been found to contain such cells. In these cases the decreased number of chiasmata may well be caused, simultaneously with decreased spiralization, by disturbed timing relationships, as

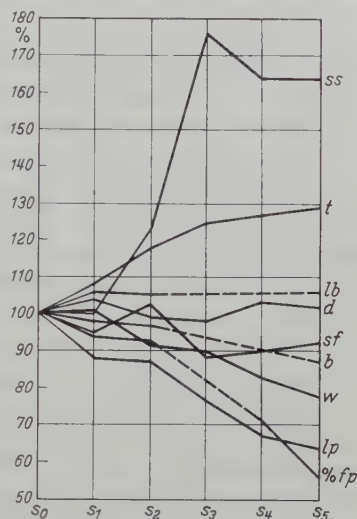


Fig. 1. Inbreeding curves. Generation averages expressed in percent of S_0 . *ss* seedset after selfing; *t* number of tillers per plant; *lb* length of bivalents at M I; *d* diameter of stem; *sf* seedset after free pollination; *b* bound chromosome arms per cell; *w* plant weight; *lp* plant height; *%fp* percent fertile pollen. --- data lacking for some generations

proposed by REES. In general, however, it is apparent that bivalent length is determined independently from chiasma frequency.

The other characters concern the macromorphology.

Tillering (Fig. 1: *t*) shows a consistent ($r = +1.0$) and strong increase, partly due to the segregation of recessive factors for very large numbers of tillers (up to 70 per plant) and enhanced by wider spacing of the plants in later generations due to loss of weak plants. On the other hand some lines with reduced number of tillers appeared, indicating that at least some of the factors affecting tillering are intermediate. Since both total tillers and large tillers increase in exactly the same way percentage-wise, only the first character is shown in the graph.

The fact that in a highly selected plant like Petkus rye high number of tillers is a recessive character, practically not apparent in the population, indicates that high number of tillers is not favorable for high seed production. This is conceivable since too many tillers cause strong competition within and between plants. Moreover, tillers are formed at certain intervals. The last ones will mature too late, are short and can thus not contribute to the production, yet require nutrients for their development.

Plant height (Fig. 1: *lp*) shows a strong and consistent ($r = -1.0$) decrease in a rather regular way.

Plant weight (Fig. 1: *w*), to which contribute both plant height and number of tillers, is intermediate between these, though yet decreasing considerably and consistently ($r = 0.94$). Other factors besides height and tillering apparently exert a strong influence on weight.

Diameter (Fig. 1: *d*) of the stem just below the head appears not to be influenced by inbreeding ($r = -0.029$). Both larger and smaller diameters than those of the population plants were found, suggesting that this diameter is determined mainly by intermediate factors, possibly in rather low number.

Although the calculation of variances for the material as a whole would not have been of use (see above), it was thought necessary to obtain at least an impression of some of the factors able to cause variation in the material, and of their importance. This will be dealt with in the following sections (II-IV).

II. Differences between years

Differences between years could be approached only by comparing equivalent generations of both groups of families, representing two consecutive years (Table 4). Only the three first generations are shown in Table 4 as of these a larger number of families were available than given in Table 3. The families not used for the construction of the inbreeding curves were those that did not produce progeny beyond S_2 . They could be used for the present purpose, however. This was especially valuable for the characters of which the lowest number of observations were available, bound chromosome arms, pollen fertility and seedset, and these are the characters that are included in Table 4. For the remaining characters the reader is referred to Table 3.

Tests of significance for the differences are possible only for S_0 , not for other generations as there segregation and irregular splitting up into subfamilies render their variances incomparable. No significant differences were found between 1949 and 1950 in bound chromosome arms ($t = 0.37$; $P > 0.7$) and in seed set after

Table 3. *Generation means. Explanation in text*

Group I						
	1949 S_0	1950 S_1	1951 S_2	1952 S_3	1953 S_4	1954 S_5
Bound chromosome arms .	13.47	13.17	12.98	—	—	11.50
Bivalent length	4.63	4.85	4.89	—	—	4.64
Percent fertile pollen . .	94.7	83.8	84.6	—	73.2	53.6
Seed set, selfed	1.6	1.6	1.9	3.1	3.0	2.9
Seed set, free	4.0	3.6	4.0	3.4	3.2	3.5
Dry weight, grams	70.0	73.0	47.0	59.3	53.6	41.1
Tillers, 2 types	11.8–10.1	17.3–11.5	14.3–10.9	16.8–11.6	14.7–11.6	15.9–11.6
Height, cm	146.7	133.2	120.0	114.3	101.3	81.5
Diameter, mm	0.97	0.97	0.93	0.94	0.96	0.96
Group II						
	1950 S_0	1951 S_1	1952 S_2	1953 S_3	1954 S_4	1955 S_5
Bound chromosome arms .	13.20	13.14	12.83	—	11.11	11.88
Bivalent length	4.61	4.95	4.81	—	5.02	5.44
Percent fertile pollen . .	84.2	89.5	83.9	—	49.9	44.0
Seed set, free	3.5	4.0	3.8	3.1	3.7	3.3
Seed set, selfed	1.8	1.8	2.6	2.8	2.5	2.7
Dry weight, grams	53.3	51.9	72.0	53.5	50.0	62.6
Tillers, 2 types	17.5–10.0	11.8–9.1	18.7–12.8	18.2–13.4	24.5–18.0	20.9–15.8
Height, cm	140.3	127.8	130.9	102.7	85.2	107.2
Diameter, mm	0.87	0.97	0.91	0.87	0.95	0.99
Total						
	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
Bound chromosome arms .	13.37	13.16	12.92	—	—	11.62
Bivalent length	4.62	4.90	4.87	—	—	4.90
Percent fertile pollen . .	91.1	86.1	84.3	—	64.6	50.6
Seed set, selfed	1.7	1.7	2.1	3.0	2.8	2.8
Seed set, free	3.8	3.6	3.9	3.3	3.4	3.5
Dry weight, grams	63.7	64.6	58.7	57.0	52.5	49.5
Tillers, 2 types	13.9–10.1	15.0–10.5	16.4–11.8	17.4–12.3	17.7–13.6	17.9–13.2
Height, cm	144.3	127.2	125.1	109.5	96.3	91.5
Diameter, mm	0.93	0.97	0.92	0.91	0.96	0.95

Table 4. *Equivalent inbreeding generations in different years*

	S_0 1949 (group I)	S_0 1950 (group II)	S_1 1950 (group I)	S_1 1951 (group II)	S_2 1951 (group I)	S_2 1952 (group II)
Bound chromosome arms .	13.32	13.22	13.03	13.17	12.87	12.95
Percent fertile pollen . .	94.5	84.6	83.8	89.8	83.6	80.8
Seed set selfed*	1.6	1.5	1.6	1.8	2.0	2.2
Seed set free*	4.0	3.5	3.6	4.0	4.0	3.8

* Classes as in Table 3.

selfing ($t=0.57$; $P>0.5$); a small, just significant difference in seed set after free pollination ($t=2.11$; $P=0.05$). A very important difference was found in pollen fertility ($t=3.32$; $p<0.01$).

Apparently 1950 was a very unfavorable year for pollen fertility, as is seen again in S_1 , where 1950 and 1951 can be compared.

1954 was found to be a year in which generally the values for number of bound chromosome arms per cell were low. It is known that weather conditions have an influence on chiasma frequency. Dry conditions usually decrease the chiasma frequency, as do high temperatures. In rye a decrease in chiasma frequency due to dry weather was found by PRAKKEN (1943). LAMM (1936) found a higher chiasma frequency in the greenhouse than in the field, which may be a similar phenomenon. MÜNTZING and AKDIK (1948) did not find significant differences between years in their material. REES (1955) found no differences between days.

During the period of fixation for the estimation of chiasma frequency in 1954 and several weeks before this period no precipitation had occurred while the air temperature was rather high and air moisture content low. In other years this period was appreciably moister and cooler. This may well be the explanation of the relatively low chiasma frequency found in 1954. It is in complete accordance with the observations cited in the literature.

The other characters are somewhat more irregular (Tables 3 and 4). The weight difference between 1949 and 1950 (both S_0) seems to be due to difference in length and perhaps also to difference in diameter of stems. It is rather surprising that in 1950 the S_1 surpasses the S_0 in weight. Increase in tillering in mainly the taller tillers and increase in diameter of the stems may be among the causes. Length, however, decreases as expected.

It is clear that in some instances year differences may be important and can explain some of the irregularities in the inbreeding curve, in this case somewhat reduced by the combination of two groups of families representing two years.

III

a) Chiasma frequency, loss of chiasmata. Since in some instances rather large differences have been found in chiasma frequency determined in M I between

Table 5. *Early and late metaphase I compared. Number of bound chromosome arms and of chiasmata per cell. Averages of 50 cells. Variance and t-values for number of bound chromosome arms.*

For terminalization see text

Plant number	Early metaphase I				Late metaphase I				
	bound arms	variance	chiasmata	terminalization	bound arms	variance	chiasmata	terminalization	t
395-3	12.46	1.08	12.90	0.55	12.32	1.06	12.80	0.60	0.68
948-1	12.98	1.10	13.44	0.80	12.34	1.42	12.78	0.84	2.83
365-2	13.64	0.27	14.24	0.82	13.34	0.42	13.90	0.84	2.52
157-2 ^a	13.90	0.09	14.22	0.85	13.64	0.31	13.90	0.80	2.89
598-2	12.98	0.86	13.16	0.88	12.42	0.96	12.52	0.91	2.90
970-1	12.42	1.52	12.66	0.76	11.54	1.69	11.76	0.74	3.44
626-1	13.30	0.61	13.96	0.63	12.94	0.54	13.78	0.74	2.42
1496-7	12.08	1.47	12.34	0.80	11.68	1.58	11.88	0.86	1.54
1499-12	11.82	1.83	12.04	0.68	11.06	2.62	11.36	0.73	2.52
1258-7	11.98	2.06	12.74	0.64	11.74	2.12	12.28	0.60	0.82
1506-14	12.68	0.98	12.90	0.72	12.50	0.69	12.70	0.69	0.97
1506-8	12.40	0.80	13.02	0.67	11.96	1.72	12.48	0.70	1.94
959-1	10.46	2.21	10.86	0.70	10.08	2.03	10.26	0.66	1.29
1504-9	10.44	2.29	10.66	0.57	9.62	4.16	9.76	0.56	2.26
1504-16	11.86	1.36	12.22	0.59	12.00	1.32	12.70	0.60	0.60

groups of cells genetically identical and physiologically apparently not in a different state, a more thorough study of first metaphase of meiosis was made.

It was then found, that, when in a group of genetically identical cells distinction could be made between early and late metaphase I, the cells in early metaphase I practically always showed a higher number of chiasmata and of bound chromosome arms than those in late metaphase I. In several cases this difference was statistically significant, especially when very early and very late metaphase I were compared. In Table 5 in all cases, except one, more chiasmata are found in early than in late metaphase I; this one case, however, is not of much value, as here the classification of metaphase was doubtful.

This difference between early and late metaphase means that not all chiasmata are maintained till anaphase and that "terminalization" does not stop at the chromosome ends; in other words it means that "anaphase" starts already at early metaphase, increases during metaphase and reaches its peak at anaphase proper. In several cases the shape of the bivalents suggests that ring bivalents change to rod bivalents and rod bivalents to univalent pairs (Figs. 2, 3). Apparently the movement of the unbound arm is very rapid to a new equilibrium position, once the last chiasma is released.

This latter can be concluded from the fact that the number of times this unbinding of arms is seen is much smaller than the number of bound chromosome arms lost.

Many oriented univalents may have arisen from rod bivalents in this way. A similar phenomenon has been observed by LAMM (1936) and again by PRAKKEN (1943) in asynaptic rye. It has also been observed by other authors in other organisms [vide GAUL (1954)] but has usually not been considered of much importance for the determination of chiasma frequency. There is no reason to assume that the chiasmata lost would be of another kind than those maintained, or even not be real chiasmata at all. It is interesting to note (Table 5) that the loss of chiasmata is in general accompanied by an increase in variance. This increase is the normal increase expected when the mean is lowered in a skew distribution (see below). This again is an indication that the loss of chiasmata is at random. Table 5 shows that chiasmata behave in the same way as bound chromosome arms, as expected.

The terminalization coefficient has been determined here as the ratio between the number of terminal chiasmata and the total number of chiasmata that are in a position to be terminalized, i.e. the outermost chiasma in each arm.

This coefficient permits a better comparison between bivalents with many and bivalents with few interstitial chiasmata than does the terminalization coefficient that takes into account all chiasmata present.

From Table 5 appears that the terminalization coefficient is on the whole not influenced by the decrease in number of chiasmata and bound chromosome arms. If terminalization would stop at the end of the chromosome arms and the unbinding would be independent of terminalization, the coefficient could be expected to be higher at late than at early metaphase. On the other hand, the terminalization coefficient would be lower at late than at early metaphase if terminal chiasmata would be lost after the arrest of terminalization only. It would also be lower, though in a much lower degree, in case two or more chiasmata occur frequently in one chromosome arm. Loss of the terminal chiasma would then probably not be accompanied by the immediate terminalization of the next

interstitial chiasma and thus tend to decrease the terminalization coefficient. This latter is unusual in the present material, however, as infrequently more than one chiasma per arm occurs.



Fig. 2. Ring bivalent changing into rod bivalent



Fig. 3. Rod bivalent changing into univalent pair

Since the terminalization coefficient does not change with loss of chiasmata and bound chromosome arms it is probable, in view of the above mentioned points, that this loss is a continuation of the normal process of terminalization of chiasmata past the end of the chromosome arm.

The phenomenon of asynapsis in rye (PRAKKEN 1943), or better desynapsis, is to some extent similar to the phenomenon mentioned here, though of much greater intensity.

Classification of the plants in Table 5 according to their chiasma frequency shows that, when plants are considered and not stages in metaphase, the terminalization coefficient tends to increase when chiasma frequency increases. This may be explained in this way that, when more chiasmata than one occur in one chromosome arm, the outermost chiasma is more inclined to terminalize than when only one chiasma occurs in one arm. Then the centromere would have a weaker influence on the final stages of terminalization than a second chiasma. The phenomenon may also be explained by a stronger loss of terminal chiasmata prior to metaphase in those plants that are found to have a lower chiasma frequency in metaphase. Part of the difference in chiasma frequency between plants is then to be explained by a difference in loss of chiasmata prior to metaphase. The loss of terminal chiasmata not immediately followed by terminalization of interstitial chiasmata would decrease the terminalization coefficient.

Quantitative evaluation of the loss of chiasmata and bound chromosome arms is severely hampered by the difficulty of estimating the stage of metaphase I. It is usually necessary to compare both extremes in a gradient from early to late metaphase. For this reason it was impossible in this preliminary study to establish differences between inbred lines, although there are some indications that such differences may exist. Usually the variation within lines is too large.

It is clear that a loss of chiasmata during metaphase can be and in several cases is found to be a cause of differences as observed between anthers, florets and fixations within plants, physiological differences then being of less importance. It is a serious source of error in the determination of chiasma frequencies, which can be avoided to some extent by taking as much as possible the same stage of metaphase in one experiment.

b) *Chiasma frequency, variance within anthers.* In many cases variances have been computed for the comparison of different means of number of bound chromosome arms. This was usually the variance between cells in 50 cells in one anther. The distribution of the cell values (number of bound chromosome arms) within anthers is probably binomial; very skew and similar to a negative Poisson distribution at high average number of bound chromosome arms, symmetrical at medium averages and again skew and similar to a positive Poisson distribution at low averages. The same is true, though less pronounced at the higher values, for chiasma frequency. Already at medium values and stronger at low values, the numbers of chiasmata and of bound chromosome arms tend to become identical, as is also pointed out by PRAKKEN (1943). As a result of these types of distribution of the cell values, the variances are strongly correlated with the means and therefore not very interesting in themselves, especially for bound chromosome arms.

This relation between mean and variance implies that, in case heterosis is found to result in higher chiasma frequencies in the region of the negative Poisson distribution (relatively high numbers of chiasmata and bound chromosome arms) the variance is bound to decrease. Thus such decrease of the variance cannot entirely be attributed to "homeostasis" (cf. REES, 1955).

MATHER and LAMM (1935) found for number of chiasmata per bivalent in population plants of rye a smaller variance between cells than within cells. LAMM

(1936) found this difference in inbred plants in some of the plants, not in others. PRAKKEN (1943) working with asynaptic rye, found the distribution of chiasmata per bivalent within cells identical with that between cells. At the higher numbers of chiasmata per bivalent, as in population plants, the counting of chiasmata becomes less reliable and the distribution skewer. Analysis of variance thus becomes less trustworthy in this region. Yet in the present study again an analysis of variance was worked out for 5 plants of Table 5, 50 cells per plant, for early and late metaphase; Table 6.

Table 6. *Analysis of variance, chiasmata per bivalent. Inbred lines, different stages of inbreeding*

Plant	Early metaphase I			Late metaphase I		
	chias- mata/cell	M.S. between cells	M.S. within cells	Chias- mata/cell	M.S. between cells	M.S. within cells
395-3 (S_2)	12.90	0.194	0.250	12.80	0.220	0.360
157-2 ^a (S_1)	14.22	0.612	0.059	13.90	0.082	0.090
970-1 (S_4)	12.66	0.302	0.225	11.76	0.273	0.317
365-2 (S_2)	14.24	0.716	0.028	13.90	0.175	0.161
948-1 (S_4)	13.44	0.218	0.217	12.78	0.282	0.262

There are no indications that the variance within cells is greater than the variance between cells. On the contrary, the plants with the highest number of chiasmata, so most resembling the population plants studied by MATHER and LAMM (1935), have a much greater between-cell than within-cell-variance. Yet by dividing the anther into groups of early and late metaphase a reduction in between-cells variance in comparison to the whole anther, could be expected.

The difference is completely lost, however, when metaphase proceeds. Possibly this can be explained by the fact that in the group "early metaphase" a considerable number of late metaphases have been included without being recognized. This would have caused an increase in variance but mainly in the between-cell-variance. In "late metaphase" such later cells would have changed to full anaphase and as such not included in the average. The within-cell-variance increases consistently with decrease of the mean.

About these problems of decrease of chiasma frequency, of difference between inter-cell and intra-cell-variance and of their interrelation, much can be speculated. For solution of the problems more very thorough study is required, however.

c) *Chiasma frequency, zones within anthers.* For all cytological observations the anther was thought divided into five zones, zone 1 at the tip, zone 5 at the base. Where possible 10 cells were taken in each zone and where this was not possible, the zone was noted from which the cells were taken. In some cases it was found that a significant difference existed between zones; this was attributed mainly to: 1. chance and 2. difference in stage of metaphase I as treated in detail in the preceeding sections.

In several anthers a gradient of stage of metaphase I was observed that caused a gradient in chiasma frequency. At first it was thought that the tip of the anther was usually in a more advanced stage of meiosis than the base, but on the whole this could not be maintained.

In 20 plants taken at random from those in which all 5 zones were in metaphase I simultaneously in one anther, the non-parametric method of "m rankings" was applied to discover a possible gradient in the anther for number of bound chromosome arms per cell. The zones were ranked 1 to 5 according to their average number of bound chromosome arms per cell (10 cells per zone); 1: lowest average. The following result was obtained:

zone 1	zone 2	zone 3	zone 4	zone 5	zones
55.5	60.0	62.0	58.5	64.0	totals
1	3	4	2	5	order

Although zone 1 is lowest and zone 5 highest, this is apparently due to chance. The "coefficient of concordance" M is 4.25, while it has an expectation value of 20 (random distribution of averages over zones) and a maximum of 400. Thus there is a strong indication that, on a average, all zones are equivalent with respect to number of bound chromosome arms per cell. The low value of M may have been caused by opposed gradients, as have indeed been found and which were caused by gradients in the stage of metaphase.

d) *Chiasma frequency, differences between florets etc.* Another source of variability may be a difference between florets in one fixation and between fixations in one plant.

Table 7. *t*-values for the differences between 2 florets per fixation and between 2 fixation per plant

2 florets		2 fixations		
Plant	t	Plant	t	
927-3	1.30	157-1	0.63	for 98 d.f. $P = 0.05 \quad t = 1.960-2.042$ $P = 0.01 \quad t = 2.576-2.750$
365-14	0.10	413-1	1.50	
909-16	1.12	265-1	1.38	
970-1	5.19**	968-4	1.45	
968-4	1.79	598-2	0.69	
608-3	0.30	117-16	1.33	
1256-8	1.28	1627-12	1.89	
1256-2	0.81	209-2	0.77	
628-1	0.36			
1262-3	1.12			
609-2	1.37			

Table 7 gives the t -values for the cases where sufficient material was available for a comparison. As the distribution within means is far from normal, t -values are more appropriate than an analysis of variance.

One individual case shows a significant difference, although on the whole the differences are not significant. The differences found can again be attributed to: 1. chance error and 2. difference in stage of metaphase I as treated in detail in Sect. IIIa, as well as to specific differences between florets and between fixations.

It is not denied, that such specific differences, especially between fixations, may exist. The differences found are no proof, however, that this is the case here.

IV. Between plant variances

In the complete material the inbreeding effect could be studied only with the aid of averages, not of variances. For the study of the change in variability in

Table 8. *Variance (s^2), mean ($\bar{x}$) and coefficient of variability (c.v.) for 4 characters. One plant per family per generation. Explanation in text**Group I (10 plants in each generation)*

	1949 S_0	1950 S_1	1951 S_2	1952 S_3	1953 S_4	1954 S_5
Bound chromosome arms						
s^2	0.050	0.432	0.285	—	—	0.583
s	0.2236	0.657	0.534	—	—	0.764
$\bar{x}$	13.47	13.09	12.96	—	—	11.58
c.v.	1.66	5.16	4.12	—	—	6.59
Plant height						
s^2	136.3	364.9	212.7	587.2	117.2	91.6
s	11.66	19.10	14.59	24.23	10.82	9.57
$\bar{x}$	147	124	118	118	105	88
c.v.	7.93	15.40	12.36	20.53	10.30	10.88
Diameter						
s^2	0.029	0.010	0.089	0.020	0.046	0.043
s	0.170	0.100	0.298	0.141	0.214	0.207
$\bar{x}$	0.97	0.99	0.97	0.88	0.82	0.91
c.v.	17.53	10.10	30.62	16.02	26.10	22.75
Fertile pollen						
s^2	24.03	117.36	105.66	—	161.50	729.60
s	4.899	10.817	10.295	—	12.689	27.019
$\bar{x}$	94.7	80.4	86.8	—	69.0	52.3
c.v.	5.17	13.45	11.10	—	18.39	51.66

Group II (6 plants in each generation)

	1950 S_0	1951 S_1	1952 S_2	1953 S_3	1954 S_4	1955 S_5
Bound chromosome arms						
s^2	0.063	0.618	0.480	—	1.439	0.413
s	0.251	0.786	0.693	—	1.20	0.643
$\bar{x}$	13.20	12.77	12.52	—	11.36	11.94
c.v.	1.90	6.16	5.61	—	10.56	5.39
Plant height						
s^2	151.20	235.02	334.00	364.80	151.20	66.60
s	12.29	15.33	18.28	19.10	12.29	8.16
$\bar{x}$	140	129	129	102	91	110
c.v.	8.78	11.88	14.19	18.71	13.51	7.42
Diameter						
s^2	0.003	0.071	0.030	0.017	0.070	0.086
s	0.055	0.266	0.173	0.130	0.264	0.293
$\bar{x}$	0.87	0.97	0.95	0.75	0.98	0.98
c.v.	6.29	27.43	18.23	17.28	26.92	29.89
Fertile pollen						
s^2	84.36	68.34	51.36	—	152.70	443.46
s	9.187	8.264	7.169	—	12.369	21.048
$\bar{x}$	84.2	87.8	84.6	—	62.4	46.7
c.v.	10.90	9.41	8.47	—	19.82	45.07

some of the characters mentioned above a part of the material that would permit such a study was taken out. Of each family one line of inbreeding was taken at random, having one plant in each generation in direct descendance. Mean and coefficient of variability of all families were calculated for each generation and for both groups of inbreeding separately (Table 8).

In most cases the increase in variability already in S_1 is striking. This is doubtlessly due to segregation. Large variability in later inbreeding generations may partly be due to decrease in phenotypic stability with homozygosis. The year influence on pollen fertility (1950) appears also in the variance.

Diameter of the stem behaves abnormally in group I, the reason for which is not clear.

For the study of the change in variability during inbreeding the availability of not more than one plant per family is a great disadvantage. It causes, besides a large sampling error, a large non-genetic error, especially when growing conditions are not under complete control. The failure of rank correlations even between later generations of inbreeding to

approach unity, is an indication of the importance of this error. They do increase, however, indicating that segregation decreases. Such rank correlations

have been calculated, but are not given here, being incomplete. Table 9 shows rank correlations for earlier generations.

The same problem is encountered when attempts are made to draw conclusions about segregations from such data. Characters that are not severely

Table 9. Rank correlation coefficients between generations (mother-daughter correlation); 10 pairs in group I; 6 pairs in group II

S_0-S_1	Group I	Group II	S_1-S_2	Group I	Group II
Bound arms	0.095	0.869	Bound arms	0.879	0.086
Plant height	0.115	0.557	Plant height	-0.003	0.800
Diameter	0.188	0.857	Diameter	-0.294	0.950
Fertile pollen	0.161	0.657	Fertile pollen	0.423	0.486

affected by the environment, as often chiasma frequency, are somewhat more favorable.

E. Selection

Finally a short note on the effect of unavoidable selection during inbreeding in a small material. During the winter 1955-1956 a large number of lines were lost due to frost damage. This was the reason the analysis of the inbreeding effects could not be carried on beyond this season. The results of this loss of lines may be a strong selection for winterhardiness. On the other hand it was observed that a shift had taken place in the averages of other characters also, apparently at random, as both groups of inbred lines can show shifts to opposed directions. This can be seen in Table 10, which is based on Table 8.

Table 10. Number of bound chromosome arms per cell. Shift in means resulting from selection for frost resistance

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7
Group I								
Surviving 1956	13.44	12.71	12.66	—	—	11.26	—	11.48
Dead 1956	13.50	13.47	13.27	—	—	11.91	—	†
Average	13.47	13.09	12.96	—	—	11.58	—	—
Group II								
Surviving 1956	13.09	13.01	13.00	—	11.81	12.38	12.58	—
Dead 1956	13.43	12.69	12.31	—	10.91	11.49	†	—
Average	13.28	12.83	12.75	—	11.30	11.94	—	—

For bound chromosome arms in group I the means in all preceding generations of the plants that survived are lower than of those that died. Thus the group average has shifted to a lower value as a result of elimination of lines with high values. In group II a shift into the other direction can be observed.

Other characters, for which the figures are not given here, react much in the same way, although in some cases no shift is found, or the data are too irregular to base a conclusion upon.

During earlier generations self fertility has been selected upon very strongly. This, and any narrowing down of the material, as has appeared inevitable at

several occasions in this material, may have had effects that have not been recognized. Selection, besides year differences and sampling errors, including systematic sampling errors as encountered in chiasma frequency (early and late metaphase), may be considered the major causes of irregularities in the inbreeding curves.

Summary

1. The effects of continued inbreeding by forced selffertilization in Petkus rye was studied over 6 generations (S_0 – S_5).

2. There were two groups of inbreeding families; one started in 1949, the other in 1950. Measurements were taken of nine more or less quantitative characters: plant height; stem diameter; number of tillers; dry plant weight; seed set after selfing; seed set after free pollination; % fertile pollen; chiasma frequency; bivalent length. The number of plants measured is given in Table 1.

3. In general strong inbreeding effects were observed. The main results are condensed into Fig. 1 (p. 343) and Table 3 (p. 345).

4. An increase in variance due to segregation was observed in the inbred generations in comparison to S_0 .

5. Some factors affecting the results were studied. These were for all characters: year effects and selection; for chiasma frequency: loss of chiasmata during metaphase, variability within anthers, differences between florets and between fixations.

Literature

GAUL, H.: Asynapsis und ihre Bedeutung für die Genomanalyse. Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb.-Lehre **86**, 69–100 (1954). — LAMM, R.: Cytological studies on inbred rye. Hereditas (Lund) **22**, 217–240 (1936). — MATHER, K., and R. LAMM: The negative correlation of chiasma frequencies. Hereditas (Lund) **20**, 65–70 (1935). — MÜNTZING, A., and S. AKDIK: Cytological disturbances in the first inbred generations of rye. Hereditas (Lund) **34**, 485–509 (1948). — PRAKKEN, R.: Studies of asynapsis in rye. Hereditas (Lund) **29**, 475–495 (1943). — REES, H.: Genotypic control of chromosome behaviour in rye. I. Inbred lines. Heredity **9**, 93–116 (1955). — Heterosis in chromosome behaviour. Proc. roy. Soc. B **144**, 150–159 (1955). — REES, H., and J. B. THOMPSON: Genotypic control of chromosome behaviour in rye. III. Chiasma frequency in homozygotes and heterozygotes. Heredity **10**, 409–424 (1956).

Dr. IR. J. SYBENGA, Laboratorium voor Erfelijkheidsleer,
Landbouw Hogeschool, Wageningen, Nederland

From Radiological Research Laboratory, Columbia University, New York, N. Y.

THE MUTATION OF *ESCHERICHIA COLI*
TO RESISTANCE TO BACTERIOPHAGES T1 AND T1s

By

R. F. HILL

With 6 Figures in the text

(Eingegangen am 30. Januar 1958)

In the course of a recent investigation of the properties of bacteriophages T1 and T1s, a plaque type variant (HILL 1958), the numbers of T1-resistant bacteria in cultures of *Escherichia coli* strain B were compared with the numbers of T1s-resistant cells. A large majority of the cultures showed more colonies when plated on T1s than on T1 while the rest showed the same number on both phages. This result could have been simply due to any of the following causes: a) bacterial resistance to these phages might arise through two completely independent gene changes; b) the T1 phage stock used in coating the plates might have had a greater number of host range variants capable of lysing some of the cells resistant to T1 and T1s; c) an artifact might be operating such that new resistant mutants might arise *after* plating to a greater extent in the presence of the T1s phage than in the presence of the T1 phage (NEWCOMBE 1953; DEMEREC et al. 1952).

These possibilities were investigated accordingly. The results showed that the first explanation was incorrect and the second and third inadequate. Instead the most reasonable explanation seemed to be one based on a phenotypic lag in the development of phage resistance. Furthermore, it appeared that resistance to T1s may be an intermediate step in the development of T1-resistance, the final stage involving resistance to both phages.

The available evidence regarding the existence of a phenotypic lag in the development of phage resistance is of two kinds. The first is the high mutation rate during the early divisions of cells when grown on agar in comparison with the rate during later divisions. This high rate was expected since when a culture is plated and phage is applied at various times, the resistant colonies appearing on plates which have received phage early, should include a number stemming from cells which had mutated *before* plating but had not developed the new phenotype until *after* plating (NEWCOMBE 1948). However, this evidence has been questioned and it has been suggested that the high rate was due to a selection artifact. When bacteria from saturated cultures are used, there may be a delayed response to phage such that mutants may arise *after* phage is applied and may be counted with those present *at* the time phage is applied (NEWCOMBE 1953).

The other evidence is that the majority of phage-resistant mutants produced by ultraviolet or x-rays (DEMEREC and LATARJET 1946) or by genetic recombination (WOLLMAN et al. 1956) do not appear until a time corresponding to many divisions of the wild type cells. Even when such delaying factors as the necessity for nuclear segregation are considered, there is still a considerable lag before all

new mutants are expressed. In the case of mutations from auxotrophy to prototrophy induced by ultraviolet, it has been shown that the observed lag of 6 divisions is not a phenotypic lag (WITKIN 1956). Although this is not necessarily true for mutation to phage resistance also, it would seem that caution is warranted before assuming that when a delay cannot be accounted for, it is probably phenotypic (RYAN 1955a).

In view of these considerations, the present results are of interest because they may be interpreted as a third type of evidence for a phenotypic lag in the development of phage resistance. Both spontaneous and ultraviolet-induced mutations will be considered.

Materials and Methods

The phages employed consisted of two stocks of Tl and one stock of Tls. Stock Tl-B was the second and Tl-D the fourth stock prepared by the confluent lysis technique, using a single plaque of the preceding stock as the source of phage (ADAMS 1950). Unless specified otherwise, stock Tl-D was used. All platings were on nutrient broth agar without added NaCl. In this situation, Tls shows a higher plating efficiency than Tl. Thus plating in this way favored Tls infection and in the absence of other considerations, would be expected to cause a higher survival of resistant colonies on Tl plates. However, as will be seen, the survival was either higher on Tls plates or the same as on Tl plates.

The plates were coated with $1-3 \times 10^9$ phages of the appropriate strain (*phaged* plates) and the number of bacteria seeded was 10^7-10^8 . The ratio of phages to bacteria was therefore 10 to 300 which is larger than the ratio of 6 regarded by BEALE (1948) as necessary to insure rapid infection of all sensitive bacteria. Increasing the number of Tls phages beyond 10^9 did not reduce the number of resistant colonies. In the experiments where the phages were sprayed onto the plates, the method of DEMEREC (1946) was used, as modified by BEALE (1948). The phage suspension contained 2×10^{10} particles per ml in broth and spraying was carried out for 3 minutes. Separate spray boxes were used for Tl and Tls.

The bacterial strains were *Escherichia coli* strains B and B/r. The cultures of B were aerated or non-aerated in broth for 24 hours. The B/r cultures were 24 or 48 hours aerated cultures in M 9 medium. All cultures were started with inocula of 100 cells from a 24 hour aerated broth culture.

The resistance pattern of colonies appearing on phaged plates was determined in two ways. The velvet transfer technique was used to imprint the colonies on fresh plates coated with the phage which was not coated on the original plate (LEDERBERG and LEDERBERG 1952). The second method consisted in suspending the colonies in 10 ml of chilled broth, washing 5 times in saline to reduce the phage concentration, re-suspending in saline, diluting and spreading equal aliquots on Tl- and Tls-coated plates.

The growth curves of the bacteria were obtained by washing the bacteria off the plates with 2 portions of 5 ml of chilled broth, diluting and assaying. To determine the rate of killing of bacteria on phaged plates, the bacteria were washed off in the same manner and assayed on plates coated with anti-phage serum in order to eliminate error due to killing on the assay plates rather than on the original plates. The anti-serum inactivated 99% of Tl in 0.5 minutes and 99% of Tls in 1 minute. The expression curves for spontaneous and radiation-induced mutations were obtained by the methods of DEMEREC et al. (1952).

The source of ultraviolet was a 15 watt G. E. germicidal lamp at a distance of 56 cm. from the samples. The bacteria to be irradiated were 48 hour aerated cultures of B/r in M 9. Samples of 9 ml were irradiated in 10 cm. petri dishes with constant agitation. For the smaller doses, the undiluted, irradiated samples were spread on phaged plates (3 plates for each type of phage treatment) to obtain the mutant colonies. The irradiated samples were also diluted and assayed on unphaged plates for the wild type survival. For the larger doses, two or more samples of 9 ml each were irradiated and pooled. The pooled material was assayed for wild type survival by removing 0.1 ml aliquots. The remainder of the pooled material was concentrated by centrifugation. The concentrated suspension was spread on phaged plates for

mutant colonies and after dilution, on unphaged plates for wild type colonies. This method made possible calculation of the survival of phage-resistant mutants on the assumption that zero point mutants observed immediately after irradiation may be survivors of the original mutant population.

All irradiation experiments were performed in a darkened room to minimize the effects of photoreactivation.

Results

Incidence of spontaneous mutants resistant to Tl and mutants resistant to Tls

A total of 64 cultures of B and 34 cultures of B/r were plated for their content of resistant mutants (Tables 1 and 2). A large majority of the cultures showed

Table 1. Comparison of average numbers of *E. coli* B resistant colonies on Tl-coated plates with numbers on Tls-coated plates

Exp. No. Type of culture	1 Non-aerated, broth	2 Aerated, broth	3 Aerated, broth	4 Non-aerated, broth	5 Aerated, broth	6 Aerated, broth
No. of cultures	19	9	10	10	9	7
Vol. of cultures, ml.	2	10	10	2	5	5
Vol. of samples, ml.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1
No. of replicate plates averaged for each phage	2	4	4	4	4	2

Culture No.	Colonies on		Colonies on		Colonies on		Colonies on		Colonies on		Colonies on	
	Tl	Tls	Tl	Tls	Tl	Tls	Tl	Tls	Tl	Tls	Tl	Tls
1	18	30	85	87	43	85	0.25	2.5	6	17	35	93
2	266	265	81	106	102	95	0.25	2.0	50	98	65	97
3	1	5	718	726	14	31	0.50	3.5	18	30	149	185
4	1	5	33	57	5	19	0	1.8	31	52	8	30
5	9	13	29	47	5	14	1.5	3.5	26	58	147	164
6	1	7	516	624	13	20	0	2.8	9	23	72	160
7	27	27	54	75	24	30	0.25	2.8	1	13	69	103
8	0	16	46	77	6	22	3.5	11	10	21		
9	8	12	23	52	5	19	0	2.3	4	15		
10	0	4			7	15	1.5	3.8				
11	151	156										
12	5	9										
13	23	44										
14	30	54										
15	11	19										
16	0	6										
17	9	10										
18	0	5										
19	5	20										

more colonies on Tls-coated plates than on Tl-coated plates. The remaining cultures showed nearly equal numbers. The statistical significance of the difference in numbers of colonies was calculated for each culture (examples in Table 3). In the case of *E. coli* B, the difference was certainly significant in 68,8% of the cultures ($t \geq 3$), possibly significant in 9,4% ($3 > t \geq 2$) and not significant in 21,8% ($t < 2$). In the case of B/r, these values were 61,8%, 20,6% and 17,6% respectively. Thus the two organisms gave essentially similar results. Taking all the cultures together, 62—82% showed a significantly greater number of colonies on Tls-coated plates.

Table 2. Comparison of average numbers of B/r resistant colonies on Tl plates with numbers on Tls plates

All cultures were aerated for 48 hours in M 9. The values shown were obtained in different experiments. Cultures which have the same number (12a, 12b, 12c, 12d, for example) constitute a parallel group started at the same time from the same culture of B/r. One tenth of a ml. was plated in all cases.

Exp. No.	Replicate plates per phage	Average number of resistant colonies on plates coated with		Exp. No.	Replicate plates per phage	Average number of resistant colonies on plates coated with	
		Tl	Tls			Tl	Tls
11a	3	11	36	21	3	17	27
11b	3	71	81	22	3	17	29
12a	2	13	37	23	3	18	28
12b	2	16	40	24	3	7	20
12c	2	6	16	25	3	23	23
12d	2	17	40	26	3	33	54
13a	2	10	30	27	3	21	40
13b	2	62	106	28a	3	29	41
13c	2	7	33	28b	3	29	61
13d	2	22	33	28c	3	26	41
14	3	51	53	28d	3	15	32
15	4	21	34	28e	3	343	343
16	4	39	52	28f	3	12	21
17	3	276	266	28g	3	16	31
18	3	14	30	28h	3	23	30
19	3	9	23	28i	3	63	82
20	3	82	86	28j	3	32	40

Table 3. Statistical analysis of difference between average numbers of resistant colonies on Tl-coated plates compared with Tls-coated plates

The number of replicate plates averaged for each type of phaging was 4. The statistical constants are:

$\bar{m}_{Tl}$, $\bar{m}_{Tls}$ = mean number of colonies on Tl-coated plates and on Tls-coated plates respectively.

$\sigma\bar{m}_{Tl}$, $\sigma\bar{m}_{Tls}$ = standard errors of the means.

D = difference between means = $\bar{m}_{Tls} - \bar{m}_{Tl}$.

σ_D = standard error of D .

$t = D/\sigma_D$.

++ = certainly significant ($t \geq 3$).

+ = possibly significant ($3 > t \geq 2$).

0 = probably not significant ($t < 2$).

Exp. No.	Culture No.	$\bar{m}_{Tl} \pm \sigma\bar{m}_{Tl}$	$\bar{m}_{Tls} \pm \sigma\bar{m}_{Tls}$	$D \pm \sigma_D$	t	Significance
3	1	42.5 $\pm$ 1.48	85.3 $\pm$ 14.7	42.8 $\pm$ 14.8	2.9	+
	2	102 $\pm$ 13.2	94.5 $\pm$ 3.65	7.5 $\pm$ 13.7	0.55	0
	3	13.8 $\pm$ 3.25	30.5 $\pm$ 1.44	16.7 $\pm$ 3.56	4.7	++
	4	5.25 $\pm$ 1.29	18.5 $\pm$ 1.74	13.3 $\pm$ 2.16	6.1	++
	5	5.00 $\pm$ 0.79	13.5 $\pm$ 2.76	8.50 $\pm$ 2.88	3.0	++
	6	12.8 $\pm$ 0.65	20.0 $\pm$ 2.34	7.20 $\pm$ 2.42	3.0	++
	7	24.0 $\pm$ 1.58	30.0 $\pm$ 2.90	6.00 $\pm$ 3.26	1.8	0
	8	5.50 $\pm$ 1.74	21.8 $\pm$ 4.65	16.3 $\pm$ 4.95	3.3	++
	9	5.30 $\pm$ 1.29	18.5 $\pm$ 1.74	13.2 $\pm$ 2.17	6.1	++
	10	7.30 $\pm$ 1.63	15.3 $\pm$ 1.56	8.00 $\pm$ 2.26	3.5	++
4	1	0.25 $\pm$ 0.216	2.50 $\pm$ 0.431	2.25 $\pm$ 0.481	4.7	++
	2	0.25 $\pm$ 0.216	2.00 $\pm$ 0.705	1.75 $\pm$ 0.735	2.4	+
	3	0.50 $\pm$ 0.433	3.50 $\pm$ 0.558	3.00 $\pm$ 0.705	4.3	++
	4	0 $\pm$ 0	1.75 $\pm$ 0.650	1.75 $\pm$ 0.650	2.7	+
	5	1.50 $\pm$ 0.745	3.50 $\pm$ 1.03	2.00 $\pm$ 1.26	1.6	0
	6	0 $\pm$ 0	2.75 $\pm$ 0.216	2.75 $\pm$ 0.216	12.7	++
	7	0.25 $\pm$ 0.216	2.75 $\pm$ 0.414	2.50 $\pm$ 0.465	5.4	++
	8	3.50 $\pm$ 0.433	11.0 $\pm$ 1.17	7.50 $\pm$ 1.25	6.0	++
	9	0 $\pm$ 0	2.25 $\pm$ 0.545	2.25 $\pm$ 0.545	4.1	++
	10	1.50 $\pm$ 0.250	3.75 $\pm$ 1.08	2.25 $\pm$ 1.11	2.0	+

Resistance pattern of colonies on phaged plates

Cross testing of the resistant colonies on plates coated with T1 or T1s by the LEDERBERG velvet transfer technique showed that all the colonies surviving in the presence of either phage were replicated on plates containing the other phage. Testing on plates coated with a mixture of T₂, T₄ and T₇ gave no replications, thereby eliminating the possibility that the original plates had been contaminated. This means that in each original colony, either all or a substantial fraction of cells were resistant to both T1 and T1s. It does not seem likely that any colonies could have consisted of uninfected bacteria or of bacteria which had been infected but had failed to lyse. Bacteria uninfected by T1s would presumably be infected upon contact with T1. Infected but unlysed bacteria would be expected to lyse upon transfer to fresh medium (HERSHEY et al. 1954; HILL 1956).

Cross testing by the method of suspension and re-plating gave the same results (Table 4). All or nearly all the cells in the original colonies were resistant to both phages. Therefore, the inequality between the numbers of colonies selected by the two phages cannot be due to the occurrence of completely independent mutations. If two

mutations are involved, they might be related in either of two ways. In the first situation, the occurrence of one mutation increases the rate of the other mutation. This possibility seems unlikely in the present case since a) the rate of the second mutation must increase to nearly 100% per bacterium and b) the order in which the mutations occur would be unimportant. To the writer's knowledge, there are no reported instances of this kind.

In the second situation, the two mutations might be related in a step-wise manner (SKOVSTED 1943) i.e. the step involving mutation to T1s resistance would precede the mutation to T1 resistance. Thus mutations appearing on T1 plates would be those for which the second step had already occurred before plating whereas the mutations on T1s plates would consist of these mutations plus others for which only the first step had occurred before plating. This situation, like the previous one, requires that the second mutation occur very shortly after the first. When this requirement is considered together with the fact that the characters involved are resistances to two very closely related phages—one of which is a mutant of the other—it would seem preferable to regard the final genotype as resulting from only one original mutation. The observed difference in selection could then be due to a phenotypic lag such that resistance to one phage (T1s)

Table 4. *Cross testing of resistant colonies appearing on T1s plates by suspension and re-plating*

A 24 hour aerated broth culture of *E. coli* B was plated on 8 plates containing 1.6×10^9 T1 each and on 8 plates containing 1.6×10^9 T1s each. The average number of colonies on T1 plates was 43 ± 7 and on T1s was 64 ± 9 . Eight colonies from the T1s plates were re-plated on one plate each containing no phage, T1 and T1s.

Original colony number	Number of colonies formed by re-suspension and plating on		
	unphaged Agar	T1-coated Agar	T1s-coated Agar
1	407	332	326
2	435	398	415
3	670	483	461
4	587	788	836
5	121	200	153
6	257	195	206
7	132	206	167
8	421	271	322

develops before resistance to the other phage. This interpretation will be discussed in more detail later.

Numbers of resistant colonies in relation to host range variants in phage stocks

Another possible explanation for the fewer colonies on Tl plates is that bacterial mutants which were resistant to both Tl and Tls were lysed by host range i.e. *h* mutants of Tl (BEALE 1948). These phage mutants could either have been present in the Tl stock or formed during the multiplication of Tl in sensitive bacteria after plating. Since the number of Tl *h* mutants formed after plating would not be the same on every plate due to the statistical nature of phage mutation, the number of B/1 cells which would be lysed would also differ on different plates. Thus repeated platings of bacteria from the same culture on Tl plates would be expected to show poor reproducibility of the number of resistant colonies. Since this is not observed (LURIA and DELBRÜCK 1943; present report, Table 3), it may be concluded that the role of phage mutations occurring after plating cannot be significant.

The influence of host range mutants present in the phage stocks initially was investigated. Stock Tl-D which was used for the preceding experiments, the Tls stock and 3 other Tl stocks were plated for their content of variants capable of forming plaques on a strain of B/1, *t*. Tl-D was found to contain 4.3×10^2 Tlh per 10^8 Tl and Tls contained 0.24 Tlsh per 10^8 Tls. Of the other Tl stocks, Tl-B was selected since it contained about the same number of host range variants as the Tls stock—0.13 Tlh per 10^8 Tl. Ten parallel cultures of *E. coli* B aerated in broth were then plated on each of these 3 phage stocks to determine whether the number of colonies on Tls and on Tl-B would be equal but different from the numbers on Tl-D.

No systematic correlation between the content of Tlh and the selection of bacterial resistants was observed (Table 5). This result is not surprising. If host range mutants are responsible for the fewer colonies on Tl plates, the concentration of such phage mutants must be comparable to that of Tl itself. If not, the chance that a given B/1 clone will be completely eliminated by encountering Tlh will be remote. That such encounters happen is shown by the occasional presence of nibbled colonies. However it appears unlikely that the number of Tlh-B/1 interactions which resulted in the complete removal of a B/1 colony was sufficiently significant to account for the fewer colonies on Tl plates.

It may be noted that the number of bacterial resistants selected by stock Tl-D did not agree with the number selected by Tl-B in 4 of the 10 cultures (Table 5). This finding will be discussed below.

Are excess colonies on Tls due to spontaneous mutants formed after plating?

As mentioned above, it has been suggested that when saturated cultures of bacteria, particularly after irradiation, are plated on agar and sprayed with phage, there may be a delayed response. This would allow new spontaneous mutations to arise, which would cause a considerable error in the determination of the numbers of resistant bacteria present at the time of phaging (NEWCOMBE 1953). In the present experiments, a similar artifact might be expected. Tls is more slowly adsorbed than Tl in liquid media (HILL 1958). If the same were

true on agar and if the ratio of phages to bacteria was not sufficiently high, bacteria on plates either coated or sprayed with TIs might produce new mutants before infection to an even greater extent than bacteria on plates phaged with TI.

The probability of this artifact depends upon the rate of killing of sensitive bacteria compared with the rate of spontaneous mutation on agar. During the lag period, if mutation occurs at all, it is at a very much reduced rate (RYAN 1955b). Therefore, if a significant number of new mutants is detected when phage is applied during the lag, these mutants must have originated at a later time—during bacterial growth.

Furthermore, phaging at different times during the lag should give different numbers of resistant colonies *unless* the onset of phage infection is delayed by decreasing amounts as a function of the time of phaging; i.e., the number of bacteria present at the end of the lag must be the same no matter when the phage is applied.

Experiments were performed to study these possibilities. The rate of killing of B/r on phaged plates was determined by seeding 0.1 ml. aliquots of a saturated culture

Table 5. *The number of resistant bacteria appearing on plates coated with phage stocks containing different numbers of host range mutants which lyse B/1, t*

The bacterial cultures were 10 parallel cultures of *E. coli* B aerated in broth. Each plate received 0.1 ml. of culture or 2×10^8 bacteria. All values are the averages of 3 platings.

Culture number	Number of colonies on plates coated with		
	1.6×10^8 TI-D 7.5×10^8 TIh	1.7×10^8 TI-B 2.2 TIh	3.5×10^8 TIs 8.4 TIsh
1	48	49	67
2	51	61	64
3	49	74	77
4	66	89	100
5	26	27	42
6	0	2	6
7	6	8	16
8	35	46	55
9	437	423	442
10	10	12	25

(aerated for 24 hours in M9 medium) on replicate phaged plates. After various periods of incubation, plates were withdrawn and the surviving bacteria were assayed as described under Materials and Methods. Seedings on unphaged plates were also made and these plates withdrawn at the same times as the phaged plates in order to determine the growth curve. The results with both kinds of phaging showed that there is no delay in the onset of infection (Fig. 1). During the lag, TIs is less efficient than TI. After division begins, both phages eliminate bacteria at the same slow rate. This is to be expected since this section of the curve represents the net effect of bacterial killing and bacterial growth. The rate of killing must still be considerable after the lag since the net curve does not show an increase in the number of viable cells but rather a continued slow decline.

Expression curves for spontaneous mutation on agar are shown in Fig. 2. At zero time, the bacteria were seeded on phage-coated plates; at later times during the lag and during growth, phage was sprayed onto seeded plates. No significant differences were observed between the number of colonies produced after immediately seeding on phage-coated plates and the colonies appearing when the phage was sprayed later during the lag. This is in contradiction to NEWCOMBE's, results (1948, Table 7). The discrepancy is probably due to a difference in experimental conditions. For growth times up to $3\frac{1}{2}$ hours, 2×10^8 B/r were plated

in the present experiments (smaller numbers of bacteria were plated for the longer growth periods) whereas NEWCOMBE plated 5 times as many bacteria. In addition, NEWCOMBE's, spray concentration was about $1/10$ of that used here.

Since a) there was no delay in phage infection when bacteria were seeded on phaged plates and b) there was no difference between the number of mutants observed at the beginning and the end of the lag, it would appear

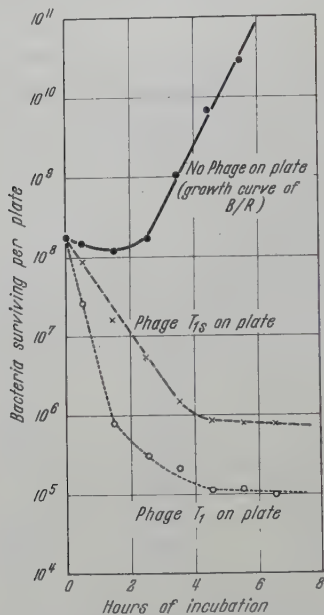


Fig. 1

Fig. 1. Survival of unirradiated *E. coli* B/r on phaged plates. Equal aliquots of a B/r suspension (aerated in M 9 for 24 hours) were seeded on nutrient agar without phage, on T1- and on T1s-coated agar. After various periods of incubation at 37° C, one plate of each type was withdrawn. The bacteria were washed off and assayed. Plates coated with anti-phage serum were used to assay bacteria washed off phaged plates. Bacteria plated: 1.7×10^8 ; T1 per plate: 1×10^6 ; T1s per plate: 3.2×10^5 . Colonies on unwashed phaged plates after 48 hours incubation: T1 plates: $18.4/10^6$ plated bacteria; T1s plates: $29.7/10^6$ (averages of 3 plates per phage)

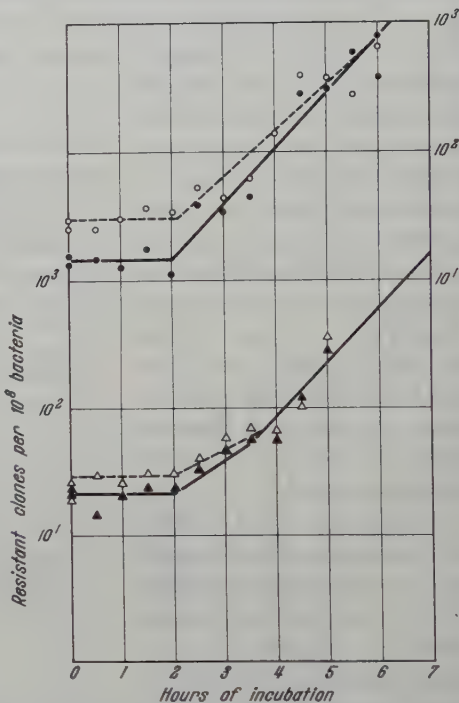


Fig. 2

Fig. 2. Spontaneous mutants of B/r appearing on T1- and on T1s-coated plates. The two sets of curves were obtained with two different cultures. The ordinates for the upper set are on the right. Open circles and triangles are for colonies on T1s plates; solid circles and triangles are for colonies on T1 plates

qualitatively at least that the mutants observed after seeding bacteria on phaged plates did not include a significant number of new ones formed after plating. The question whether the greater number of colonies on T1s plates is due to such an artifact can, however, be analyzed more quantitatively in the following manner.

We will consider the colonies appearing on T1 plates to represent the true number of mutants present at the time of phaging with either phage. This need not be correct but can serve as a convenient base from which to determine how many *additional* colonies can be expected on T1s plates. Fig. 3 shows a combined plot of the observed rate of appearance of new T1-resistant clones and the rate of killing of B/r by T1s. In order to estimate the number of additional resistant clones that could have appeared on T1s plates during residual growth, we will

next assume that all the bacteria on these plates which are still surviving at the beginning of a division period, survive and divide by the end of the division. The observed spontaneous mutation curve is shown at the beginning of each division period. The number of new mutants produced in each such period is given by the ordinate at the right which corresponds to the intersection of the spontaneous mutation curve with the abscissa representing the end of the period. This procedure gives a maximum estimate of the number of new mutants produced at each division because the bacteria are actually decreasing during each division period.

The total number of new mutants at the end of 14 divisions is 6. The rate of appearance of new clones at the fourteenth division is about 0.1 clone per division. At this rate, which is again a maximum since it actually declines slowly, 5 new mutant clones will be produced after the fourteenth division period (over a 24 hour period—colonies being counted at 48 hours). Thus the maximum number of additional colonies on T1s plates should be 11. However, the results for the 98 cultures of Tables 1 and 2—using only statistically significant differences—showed that 47 cultures gave more

than 11 additional colonies, including 22 which gave more than twice this maximum estimate. Evidently the rate of killing by T1s in comparison with the rate of spontaneous mutation as measured on T1 plates can account for the results in only about half of the cultures and even then by overestimating the numbers of new mutants to be expected.

Since both qualitative and quantitative considerations make it unlikely that the greater number of colonies on T1s is due to mutations occurring after plating, it appears that some other process must be responsible.

Phenotypic lag in the development of phage resistance

In the above analysis, it was assumed that the only new resistants which could appear on phaged plates would be new ones arising after plating. However, if a phenotypic lag in the development of phage resistance exists, the plated cells

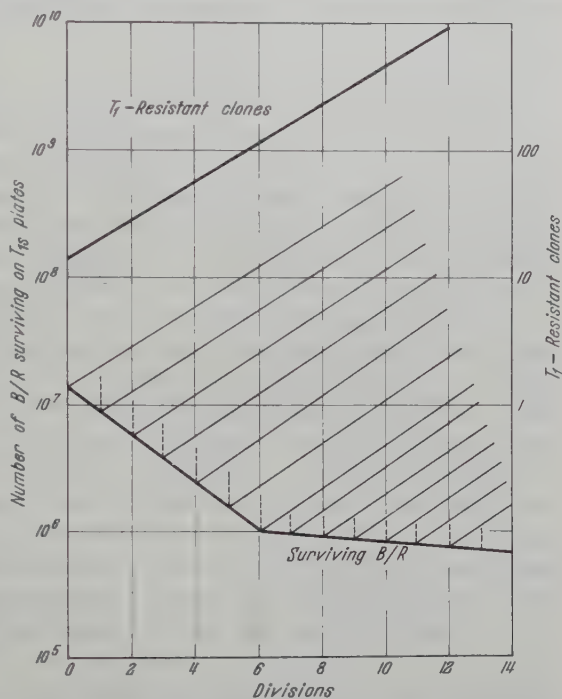


Fig. 3. A combined plot of the B/r colonies surviving on T1s plates and the rate of appearance of new spontaneous mutant colonies on T1 plates. The mutation curve is shown at the beginning of each division period. The number of new mutants expected during a given division is given by the ordinate on the right corresponding to the intersection of the mutation curve drawn at the beginning of the division and the abscissa line for the end of the division. The abscissa lines are the broken ones

would contain a number which had mutated before plating and which might be in various stages in the development of full resistance (NEWCOMBE 1948). If these cells, by virtue of being more resistant than the wild type, although not necessarily fully resistant, are killed at a slower rate on the Tls plates than on the Tl plates, they would have a greater chance to develop an even greater resistance. The additional colonies on Tls plates could then be accounted for. Thus, the selection artifact discussed above would refer to incompletely expressed mutants rather than to completely sensitive wild type cells.

Phage Tls has a slower rate of adsorption and a smaller burst size than Tl. Thus infection by Tls is less efficient than infection by Tl. If a mutated cell goes through stages of decreasing ability to be successfully infected by Tl—as a phenotypic lag might imply—it would seem possible that at an early stage the mutant cell might exhibit a relatively high degree of resistance to Tls and a relatively low resistance to Tl. Upon plating, such cells would survive on Tls plates and upon further growth, develop full resistance to Tl also.

This hypothesis was tested in the following way. If a mutant clone has not gone through many divisions, most of the members will not have developed full resistance to both Tl and Tls. If the clone is large, few members, if any, will still be in the transitional stage of greater resistance to Tls than to Tl. When there are many mutants in a culture, these may come either from a few mutations which have occurred early in the growth of the culture or from many late mutations. Since these two situations are equally probable, some cultures with many mutants may show great differences in selection by Tls compared with Tl, while others may show nearly equal numbers of colonies on both kinds of plates. On the other hand, in cultures with small numbers of mutants, the predominating possibility is that of few mutations and few divisions of the new mutants. Therefore when many cultures are compared, there should be a tendency for those with fewer mutants to show relatively greater differences between the number of colonies on Tls plates compared with Tl plates.

Since resistance to Tls is assumed to appear first, the number of colonies on Tls plates will be a closer approximation to the total number of mutant cells present in the culture than will the number of colonies on Tl plates. From the number of colonies shown by samples plated on Tls plates and from the volume of the culture, the total number of Tls-resistant mutants was obtained for each of the 98 cultures of Tables 1 and 2. The number of divisions of mutants which must have produced this number was then calculated in each case. Of course, the number of divisions comes from an unknown number of mutational events. However, this is not important since a) the uncertainty applies to all the cultures and b) the comparison to be made does not select cultures in a way which would reflect this uncertainty.

In order to compare the cultures, the difference in selection by Tl and Tls was expressed as the *additional number of colonies on Tls plates per 10^8 plated bacteria*. This value varied from 0 to 120 per 10^8 . The cultures were grouped according to this value. The average number of divisions of mutants was then obtained for each group. The results (Table 6) clearly show an inverse correlation between the number of divisions of mutants and the difference in selection by the two phages. The statistical significance of this finding is shown by the analysis

Table 6. *Statistical analysis of possible correlation between number of additional colonies on Tls plates and number of divisions of mutants*

The cultures were those of Tables 1 and 2. The statistical constants are:

n = number of cultures.

$\bar{d}$ = average number of divisions of mutants.

$\sigma_{\bar{d}}$ = standard error of $\bar{d}$.

D = difference between $\bar{d}$ for different groups.

σ_D = standard error of D .

$t = D/\sigma_D$

A. Average number of divisions corresponding to different values of the additional colonies on Tls plates per 10^8 plated bacteria:

Group	n	Additional colonies per 10^8	$\bar{d}$	$\sigma_{\bar{d}}$
I	39	0—10	12.45	0.423
II	34	11—20	11.51	0.479
III	25	21—120	9.62	0.660

B. Significance of D :

Groups	D	σ_D	t
I—II	0.94	0.637	1.5
II—III	1.89	0.814	2.3
I—III	2.83	0.778	3.6

for the difference between groups. Thus for Group I, the *number of additional colonies on Tls plates* was 0—10 per 10^8 and the average number of divisions of mutants was 12.45; for Group III, these values were > 21 per 10^8 and 9.62. The t value for the difference of 2.83 divisions shown by the two groups was 3.6. The probability that the difference in number of divisions is due to chance is about 10^{-4} . In view of the wide fluctuation in values within each groups, as must be expected because of the random nature of mutation, the clear correlation is striking. Hence the basic assumption of a phenotypic lag in which Tls resistance develops first, appears to be valid.

It should be pointed out that the use of the number of divisions in comparing the cultures does not necessarily mean that the development of resistance depends upon cell division. The comparison could just as well have been made by translating divisions into time units. The results would have been the same since all values would have been multiplied by the same factor.

If a physiological lag is responsible for the greater number of colonies observed on Tls plates, the diversity of results when different stocks of Tl are used needs explanation (Table 5). The question is why the number of colonies should depend on the Tl stock. The answer may be that, although resistance to Tls develops before resistance to Tl in a mutant cell, the cell can be more resistant to one Tl population than to another; i.e. different populations of the same phage may not be identical. In their extensive study of plaque formation by T3 on resistant strains of *E. coli* B, FUKUMI and NOJIMA (1954) showed that the differences in plating efficiencies between different T 3 stocks could not be due simply to difference in their contents of host range variants. They concluded that the *infective power* toward resistant hosts (or "titer-ratio" as they called it) of each wild type virus

particle was different in different virus stocks. The point of view of these authors was that the phage resistance of bacteria is a *quantitative* matter and has different values for a) the same strain of bacteria and different phage populations of the same wild type and b) different resistant strains and the same phage population. The results in Table 5 may be interpreted by extending this approach to the case of different stocks of T1 and of bacteria at various stages in the development of resistance. Thus some cells which have passed the stage of relatively greater resistance to T1s may be more resistant to one T1 population than to another.

Ultraviolet-induced mutations to phage resistance

Two kinds of radiation-induced mutants have been reported: a) *zero-point* mutants which are observed immediately after irradiation and b) *delayed* mutants which appear only during the growth of irradiated cells (DEMEREK and LATARJET 1946). The existence of the former type has been questioned. It has been suggested that they are really delayed mutants which are observed after immediate phaging because of prolonged survival of irradiated cells in the presence of phage—a situation essentially the same as that suggested for the case of spontaneous mutants (NEWCOMBE 1953).

Table 7. *Survivals of B/r and of phage-resistant mutants when plated immediately after ultraviolet irradiation*

The ultraviolet dose was 3 minutes or approximately 2000 ergs per sq. mm. All values are the averages of 3 platings.

Exp. no.	Unirradiated			Irradiated		
	B/r/ml. ($\times 10^9$)	colonies on		B/r %	survival of colonies on	
		T1-coated plates ($\times 10^{-4}$)	T1s-coated plates ($\times 10^{-4}$)		T1-coated plates %	T1s-coated plates %
11a	2.5	4.4	14	0.37	1.8	8.5
11b	1.3	53	60	0.34	0.37	24
12a	1.3	10	29	0.51	1.1	58
12b	1.4	11	28	0.71	1.4	60
12d	1.4	13	29	0.95	2.3	93
13a	0.89	11	34	0.14	10	57
13b	1.4	45	77	1.0	1.5	33
13c	1.3	5.0	25	0.53	1.6	34
13d	1.5	15	22	0.84	1.2	63
14	1.1	46	49	0.55	0.74	47
15	1.1	19	31	0.50	1.6	67
16	1.4	28	38	0.33	0.25	14
17	0.80	345	332	1.7	1.9	5.6
18	1.0	14	20	0.76	2.4	37
19	0.76	12	31	0.38	28.5	100
20	1.2	71	75	0.50	0.83	6.5
21	1.4	12	19	0.68	3.7	93
22	1.2	14	24	0.67	2.8	21
23	1.1	17	26	1.4	2.4	27

The probability of this artifact is determined, as in the case of spontaneous mutations, by the relative rates of killing of irradiated wild type cells by phage and of the appearance of the new delayed mutants. The same considerations regarding phaging during the lag, as were discussed for spontaneous mutations, apply to induced mutations. Therefore the same type of experiments were performed with irradiated cultures of B/r.

Fig. 4 shows the rate of killing by phage when irradiated B/r was immediately plated on Tl- and on Tls-coated plates. There was no delay in the onset of infection. Comparison of Fig. 1 and 4 shows that the initial rate of killing of irradiated cells by both phages was greater than the corresponding rates for unirradiated cells. Since the parts of the curves representing the net effects of

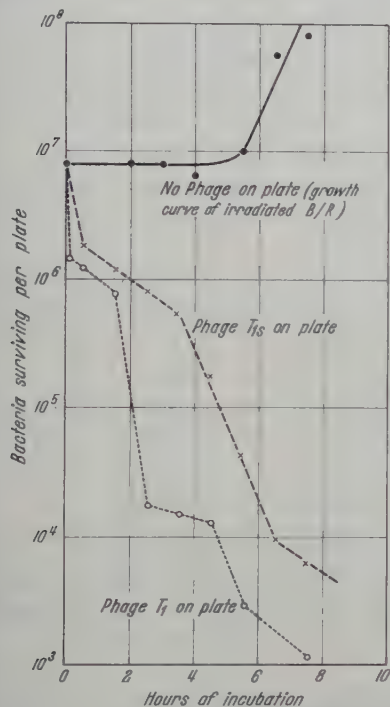


Fig. 4

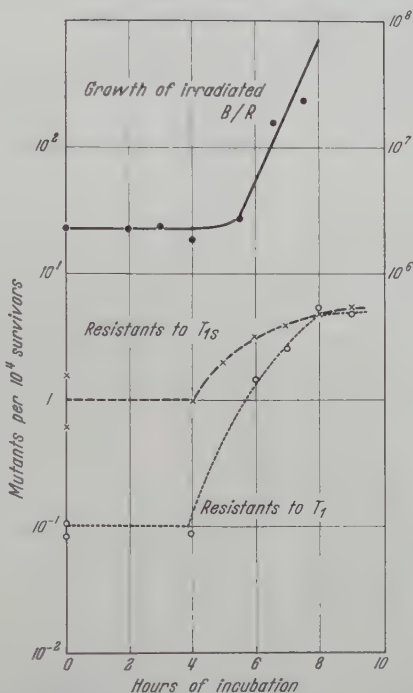


Fig. 5

Fig. 4. Survival of irradiated B/r after immediate seeding on phaged plates. The procedure was the same as the one used to obtain Fig. 1. Ultraviolet dose: 2000 ergs per mm². Bacteria plated: 8.2×10^6 viable (1.2×10^8 total); Tl per plate: 1.6×10^8 ; Tls per plate: 3.2×10^8 . Culture 22 in Table 7

Fig. 5. Expression curves for the appearance of ultraviolet-induced mutants of B/r. Ultraviolet dose: 2000 ergs/mm². Survival 0.38 %. Culture 19 in Table 7

killing and growth show a continuous decrease of surviving bacteria, the rate of killing must be considerable after the lag.

Fig. 5 gives typical expression curves for the ultraviolet-induced mutations. No difference was found between the numbers of colonies appearing when the irradiated bacteria were immediately seeded on phage-coated plates and when phaging was done later in the lag period. Therefore it seems that in both irradiated and unirradiated cultures, the number of expressed mutants observed by phaging at any time during the lag is not markedly different from the number of such mutants present at that time.

Fig. 5 and Table 7 show that a greater number of colonies appears on Tls plates when phaging is done during the lag than on Tl plates. In 10 out of the 19 cultures of Table 7, the survival of resistant colonies on Tl-coated plates was less than a factor of 2 greater than the survival of wild type B/r. In these cases, it might be considered that there was no significant increase in the number of

Tl-resistants after irradiation. In 9 cultures, the survival of Tl-resistants was more than 2 times higher than the survival of B/r. In every culture, the survival of colonies on Tls plates was considerably higher than either the B/r survival or the survival on Tl plates.

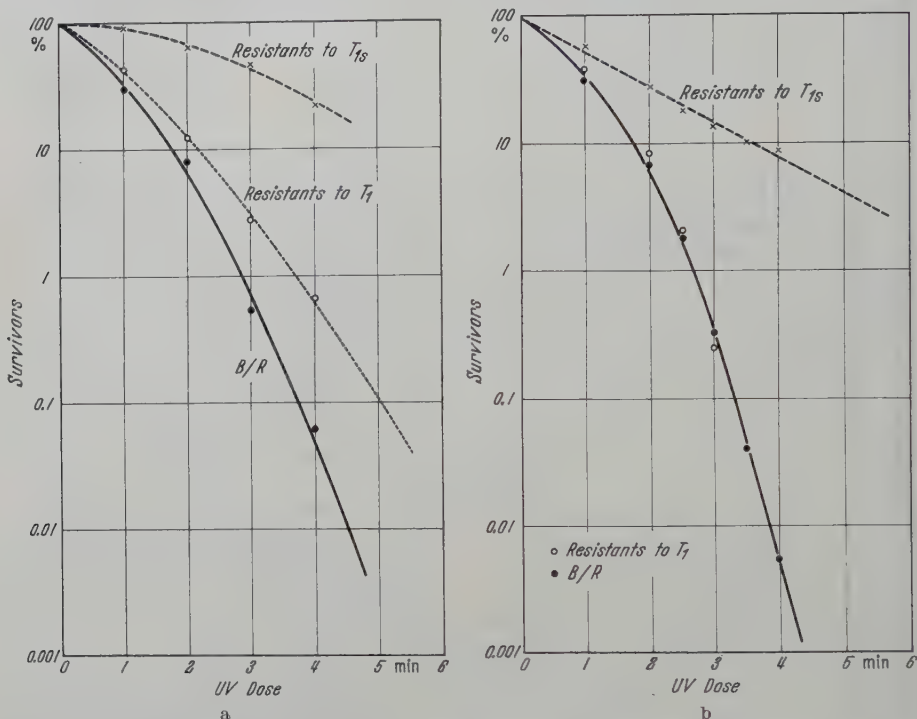


Fig. 6 a u. b. Survival curves for B/r and for colony formation on Tl- and on Tls-coated plates after ultraviolet irradiation. Two experiments are shown: a) Culture 14 in Table 7; b) culture 16 in Table 7. Culture 16 shows no zero-point mutants resistant to Tl

Table 8. Cross testing of resistant colonies of irradiated B/r appearing on Tls plates, by suspension and re-plating

A 48 hour aerated culture of B/r in M9 was irradiated with ultraviolet to a survival of 0.71% (Table 7, experiment 12b). After plating on phaged plates, 100 times as many colonies appeared on Tls plates as on Tl plates. Eight colonies from a Tls plate were re-suspended, washed, diluted and replated on Tl and on Tls plates and on unphaged agar (one plate of each type).

Original colony number	Numbers of colonies on		
	unphaged Agar	Tl-coated Agar	Tls-coated Agar
1	324	440	333
2	145	229	259
3	754	532	634
4	222	277	202
5	416	311	169
6	215	224	134
7	255	256	237
8	312	321	217

Table 8 shows that colonies present on Tls plates, like those observed in the case of unirradiated cultures, consisted of cells resistant to both Tl and Tls.

Fig. 6 shows the survivals of B/r and of colony formation on Tl and Tls plates for a series of ultraviolet doses. The culture of Fig. 6b showed no "zero point" mutants resistant to Tl.

The expected number of colonies on Tl- and on Tls-coated plates due to prolonged survival of irradiated B/r can be estimated from the data of Fig. 4 and the results of repeated determinations of the expression curves of the type in Fig. 5. These repeated determinations showed that the plateau of the expression curve was reached after 8 hours (about 12 divisions). The plateau value for the number of new mutations averaged 5.3 per 10^4 surviving B/r (individual values were 5.9, 5.3 and 4.6 per 10^4).

A simplified estimate is obtained as follows. The decrease in viable cells after the 4 hour lag is given approximately by

$$N_t = N_0 e^{-\alpha t}$$

N_0 is the number of cells surviving at the end of the lag. The average number of viable cells during the next 4 hours is

$$\bar{N} = \frac{N_0 (1 - e^{-4\alpha})}{4\alpha}$$

The expected number of resistant colonies due to survival of irradiated cells in the presence of phage is then given by

$$E = \frac{5.3 \bar{N}}{10^4}$$

For Tl, $N_0 = 0.2\%$ of the number of viable cells plated and $\alpha = 0.66$ per hour; For Tls, $N_0 = 2\%$ and $\alpha = 1.39$ per hour. If we designate the number of viable cells plated as N_{00} , the final equation for Tl is

$$E_{Tl} = (3.72 \times 10^{-7}) N_{00}$$

and for Tls

$$E_{Tls} = (1.90 \times 10^{-6}) N_{00}$$

These expressions give overestimates because a) the number of cells viable during the first three divisions accounts for almost all of the expected number of delayed mutants when, in fact, the bulk of the mutants would not appear until the last few divisions when the viable population is very small (Fig. 5) and b) the value of α is too small since it is calculated from the total number of surviving cells instead of the number of surviving clones. The expected number of excess colonies can be obtained more accurately by determining the number that would appear at each division, assuming that all the cells surviving at the beginning of each division period do divide and by determining the rate of appearance of new mutants during each division. This method involves rather tedious calculations but gives results 40% lower than those obtained using the average number of survivors during 12 divisions.

A comparison between the calculated estimates of the additional colonies expected after immediately plating irradiated B/r on phage with the numbers observed is given in Table 9. The observed numbers are corrected for surviving spontaneous mutants on the assumption that these have the same ultraviolet sensitivity as wild type B/r. When plated on Tl, 17 of the 19 cultures gave observed excesses which were either less than or very nearly equal to the estimated values.

Table 9. *Expected and observed numbers of colonies in excess on phaged plates after immediate plating of irradiated B/r*

The number expected is calculated by assuming that the excess is due to delayed mutants appearing among surviving B/r. Equations are given in the text. The number observed is the difference between the number of colonies counted and those which would be due to surviving spontaneous mutants, assuming no difference in radiation sensitivity between B/r and phage-resistant mutants in each culture.

Culture Number	Tl plates			Tls plates		
	no. of viable B/r plated	expected excess mutants	observed excess mutants	no. of viable B/r plated	expected excess mutants	observed excess mutants
11a	6.6×10^7	24	11	6.6×10^7	124	210
11b	1.8×10^7	7	0	1.8×10^7	34	740
12a	1.5×10^7	6	2	1.5×10^7	29	481
12b	2.2×10^7	8	3	2.2×10^7	42	520
12d	1.9×10^7	7	3	1.9×10^7	36	529
13a	4.0×10^6	2	30	2.0×10^6	4	261
13b	3.8×10^7	14	8	1.9×10^7	36	452
13c	2.0×10^7	8	2	1.0×10^7	19	158
13d	2.8×10^7	10	2	1.4×10^7	27	229
14	1.5×10^7	6	2	7.5×10^6	14	306
15	1.1×10^7	4	3	5.5×10^6	11	226
16	2.7×10^7	10	0	6.7×10^6	12	215
17	8.1×10^7	30	0	2.0×10^7	38	171
18	1.7×10^7	6	5	4.3×10^6	8	80
19	4.6×10^6	2	49	1.2×10^6	3	62
20	1.5×10^7	6	7	3.8×10^6	7	32
21	1.6×10^7	6	8	7.8×10^6	14	196
22	2.8×10^6	1	6	7.0×10^5	1	24
23	1.1×10^7	4	1	1.1×10^7	21	84

Two of the cultures (13a and 19), when plated on Tl, and all of the cultures, when plated on Tls, gave observed excesses considerably greater than the maximum estimates. These results indicate that in the case of Tl, the small numbers of *zero-point* mutants which are observed in about 50% of the cultures are probably *delayed* mutants. However, in about 10% of the cultures plated on Tl and in all of the cultures plated on Tls, the large numbers of *zero-point* mutants are due to some process other than growth of radiation-surviving B/r in the presence of phage.

In the discussion of the case of the greater number of spontaneous mutants appearing on Tls plates, it was pointed out that this could be accounted for by prolonged survival provided the plated population contained incompletely expressed mutants which were killed by phage at a slower rate than unmutated cells. The same consideration applies to the present case where an irradiated population is plated. Since the additional number of colonies on Tls is too great to be accounted for by new radiation-induced mutants, it might be due to spontaneous mutants which survive the irradiation but are unexpressed before plating. If the rate of killing of these mutants by phage was not affected by irradiation, the ratio of colonies on Tls to colonies on Tl would be constant. However, this ratio increased greatly after irradiation (Table 7). This may be due to an increased sensitivity to Tl, a decreased sensitivity to Tls or an unequal combination of both.

The part of the expression curves (Fig. 5) showing the appearance of delayed mutants supports the hypothesis that the additional colonies on Tls plates observed

after immediate plating of irradiated cultures are due to surviving incompletely expressed spontaneous mutants. If relatively greater resistance to Tls is an intermediate step in the development of full resistance, it would be expected that the expression curve for Tls-resistance should a) have the same general shape as that for Tl-resistance, b) show larger numbers of resistant than the Tl curve during the period of increase, and c) reach the same plateau value. These expectations were fulfilled (Fig. 5).

The expression curves for resistance to Tl and to Tls reach their maxima at about the same time. If after spraying with Tls, the irradiated bacteria were able to survive for some time before infection, the number of mutant colonies on Tls would correspond to those observed by spraying with Tl at a later time. As a result, the maximum on the Tls curve should be reached at an earlier time than the maximum on the Tl curve. The fact that the maxima are reached at very nearly the same time indicates that a) the number of colonies appearing on Tls plates as the result of spraying cannot be significantly different from the number of Tls-resistant clones present at the time of spraying and b) the time required for a Tls-resistant cell to develop resistance to Tl cannot be more than the equivalent of one or two divisions.

Complete expression of all new induced mutants on Tl-coated plates required the time equivalent of 12 divisions, in agreement with the values reported by others (DEMEREK and LATARJET 1946). The present experiments give no clue as to the reason for so long a delay. It is unlikely that the stages in phenotypic development preceding the appearance of resistance to Tls can be responsible since NEWCOMBE (1953) has estimated that the total phenotypic delay from the mutational event to the appearance of resistance to Tl is only the equivalent of 2 or 3 divisions. It may be noted that the 1—2 division lag between resistance to Tls and resistance to Tl is therefore reasonable.

Finally, it was mentioned above that the total number of delayed mutants found in 3 experiments averaged 5.3 per 10^4 survivors. The dose in all 3 experiments was 2000 ergs per mm^2 (0.5% survival of B/r). Since the same number of mutants is produced after a dose of 800 ergs per mm^2 corresponding to 10% survival (DEMEREK et al. 1952), it appears that the number of radiation-induced mutations to phage resistance does not increase at high doses (NEWCOMBE 1953).

Summary

The number of phage-resistant mutants in unirradiated and in ultraviolet-irradiated cultures of *E. coli* strains B and B/r is usually greater when the selecting agent is Tls. It is shown that this cannot be explained by a) completely independent gene changes, b) the presence of host range phage mutants or c) new mutations due to prolonged survival of wild type bacteria in the presence of phage. Evidence is presented which indicates that the difference in selection by Tl and Tls may be explained satisfactorily by the presence of incompletely expressed bacterial mutants in the cultures before plating. This constitutes indirect evidence for a phenotypic lag. It is shown further that the development of resistance to Tls probably precedes the development of full resistance to both phages.

The appearance of new ultraviolet-induced mutations, selected by Tls, is found to fulfill expectations based on the existence of such a phenotypic lag.

Acknowledgments. The author is indebted to Drs. H. H. ROSSI and F. J. RYAN for helpful discussions and encouragement and to Mrs. ASTRIDA SILGAILIS for invaluable technical assistance.

Zusammenfassung

Die Anzahl der phagenresistenten Mutanten in unbestrahlten und UV-bestrahlten Kulturen der *E. coli* Stämme B und B/r ist im allgemeinen größer, wenn die Selektion mit TIs durchgeführt wird. Dieses kann nicht erklärt werden durch a) vollständig unabhängige Genveränderungen, b) die Gegenwart von „host-range“ Phagenmutanten, oder c) neue Mutationen bedingt durch längeres Überleben von Wildtypus-Bakterien in der Gegenwart von Phagen. Es wird gezeigt, daß der Unterschied in der Selektion von TI und TIs ausreichend erklärt werden kann durch die Gegenwart von unvollständig manifestierten Bakterienmutanten, die vor dem „plating“ in den Kulturen vorhanden sind. Dieses bildet indirekten Beweis für eine phänotypische Lagphase. Es wird weiterhin gezeigt, daß die Entwicklung der Resistenz gegenüber TIs wahrscheinlich der Entwicklung von Vollresistenz gegenüber beiden Phagen vorangeht.

Das Auftreten von neuen UV-induzierten, durch TIs selektierten Mutanten stimmt mit dem Vorhandensein einer derartigen phänotypischen Lagphase überein.

Literature

- ADAMS, M. H.: Methods of study of bacterial viruses. *Meth. med. Res.* **2**, 1—73 (1950). — BEALE, G. H.: A method for the measurement of mutation rate from phage sensitivity to phage resistance in *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.* **2**, 131—142 (1948). — DEMEREC, M.: Induced mutations and possible mechanisms of the transmission of heredity in *Escherichia coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **32**, 46—56 (1946). — DEMEREC, M., and R. LATARJET: Mutations in bacteria induced by radiation. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **11**, 38—50 (1946). — DEMEREC, M., E. M. WITKIN, E. L. LABRUM, I. GALINSKY, I. HANSON, Y. FLINT, H. MONSEES and T. H. FETTERSTON: Bacterial genetics. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*, **51**, 193—205 (1952). — FUKUMI, H., and T. NOJIMA: An essential feature of host range mutation—Third report of host-controlled variation. *Jap. J. med. Sci. Biol.* **7**, 585—614 (1954). — HERSHEY, A. D., A. GAREN, D. K. FRASER and I. D. HULIS: Growth and inheritance in bacteriophage. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook* **53**, 210—225 (1954). — HILL, R. F.: Effect of prolonged incubation of *Escherichia coli* on the reproduction of phage T1. *J. Bact.* **71**, 493—495 (1956). — A comparative study of *Escherichia coli* phages T1 and a plaque type mutant. *J. Bact.* **75**, 63—71 (1958). — LEDERBERG, J., and E. M. LEDERBERG: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.* **63**, 399—406 (1952). — LURIA, S. E., and M. DELBRÜCK: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**, 491—511 (1943). — NEWCOMBE, H. B.: Delayed phenotypic expression of spontaneous mutations in *Escherichia coli*. *Genetics* **33**, 447—476 (1948). — The delayed appearance of radiation-induced genetic change in bacteria. *Genetics* **38**, 134—151 (1953). — RYAN, F. J.: Phenotypic (phenomic) lag in bacteria. *Amer. Naturalist* **89**, 159—162 (1955a). — Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. *Genetics* **40**, 726—738 (1955b). — SKOVSTED, A.: Successive mutations in *Nadsonia Richteri* Kostka. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.* **23**, 409—454 (1943). — WITKIN, E. M.: Time, temperature and protein synthesis: A study of ultraviolet-induced mutation in bacteria. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 123—140 (1956). — WOLLMAN, E.-L., F. JAKOB and W. HEYES: Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 141—162 (1956).

Dr. R. F. HILL, Radiological Research Laboratory, Columbia University,
New York, N.Y. USA

Aus dem Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien

DIE KOPPELUNGSVERHÄLTNISSE BEI DEN BEIDEN
GESCHLECHTERN VON *MEGASELIA SCALARIS* LOEW
(= *APHIOCHAETA XANTHINA* SPEIS). (*PHORIDAE*)

Von

ROBERT SPRINGER

(Eingegangen am 17. März 1958)

Für die Phoride *Megaselia scalaris* LOEW¹ wurde von ONDRASCHEK (1953) partiell geschlechtsgebundene Vererbung für zwei Genloci nachgewiesen. Der eine Locus „oc“ zeigt im Männchen $1.13 \pm 0.25\%$ Austausch mit dem geschlechtsbestimmenden Anteil des Y-Chromosoms. In der vorliegenden Untersuchung soll ein Vergleich zwischen den Austauschwerten im weiblichen und männlichen Geschlecht gezogen werden. Für eine autosomale Koppelungsgruppe standen die Mutanten *yellow*, *y* (ONDRASCHEK l. c.) und *short arista*, *sa* im Allel *sa*⁰ (TOKUNAGA 1949—1952) zur Verfügung. Für das Geschlechtschromosomenpaar wurden die partiell geschlechtsgebundenen Loci *occhi chiari*, *oc* (ONDRASCHEK l. c.) und *Abrupt*, *Ab* im Allel *Ab*³ (TOKUNAGA l. c.) verwendet. Es ist wahrscheinlich, daß der inzwischen verlorene Faktor *radius*₄ *reduced* von ONDRASCHEK ein Allel von *Abrupt* war. *Ab*³ ist dominant mit vollständiger Penetranz, aber schwankender Expressivität, und homozygot letal. Die Vitalität dieser Mutanten ist für die Versuche genügend gut. Die Unterschiede zwischen den unkorrigierten und den durch Aufrundung der durch einfache oder doppelte Homozygotie in ihrer Vitalität benachteiligten Klassen korrigierten Werten sind so gering, daß sie fast immer innerhalb des einfachen mittleren Fehlers der unkorrigierten Verhältniszahlen fallen. Im folgenden ist daher auf jede Korrektur der Versuchszahlen verzichtet worden.

In der autosomalen Gruppe ergab die Rückkreuzung ♀ *y sa*/++ × ♂ *y sa*/*y sa* bei einer Gesamtzahl von 1149 Nachkommen einen Austausch von $31.07 \pm 1.37\%$ zwischen *y* und *sa*. Die reziproke Kreuzung ♀ *y sa*/*y sa* × ♂ *y sa*/++ ergab bei *n* = 3906 einen Austausch von nur $0.205 \pm 0.072\%$. Der Austausch ist also für diesen Bereich des III-Chromosoms im weiblichen Geschlecht etwa 150mal häufiger als im männlichen Geschlecht.

Zur Prüfung des Austausches zwischen den partiell geschlechtsgebundenen Loci *Ab* und *oc* im Weibchen wurde das doppelt heterozygote Weibchen *Ab* ++ *oc* mit dem doppelt rezessiv homozygoten Männchen ++ *oc*/++ gekreuzt. Bei *n* = 6609 ergab sich ein Austausch von $10.61 \pm 0.38\%$ zwischen *Ab* und *oc*. Um den

¹ Nach freundlicher Auskunft des Phoridenkenners P. H. SCHMITZ S. J. (Bad Godesberg) ist der Name *scalaris* LOEW 1866 für die Art gültig. Synonyme: *Aphiochaeta xanthina* SPEISER 1907, *circumsetosa* DE MEJERE 1911, *ferruginea* BRUNETTI 1912 und *repicta* SCHMITZ 1915; *Phora conjuncta* BECKER 1908, *fissa* BECKER 1908. Die Art ist ein Kosmopolit der tropischen und subtropischen Zonen. Kreuzungen von Stämmen aus Südjapan, Missouri (USA) und Zentralafrika mit unserer aus Neapel stammenden Linie und untereinander ergaben eine deutliche Heterosis und volle Fertilität.

Austausch im männlichen Geschlecht zu prüfen, wurde das Weibchen $+ oc/+ oc$ mit dem Männchen $Ab +/+ oc$ gekreuzt, das Ab im X-Chromosom und oc im Y-Chromosom führt. Hier ergab sich bei $n=2748$ ein Austausch von nur $1,89 \pm 0,22\%$ zwischen Ab und oc . In einem anderen Versuch wurde das Weibchen $+ oc/+ oc$ mit dem Männchen $+ oc/Ab +$ gekreuzt, in dem das X-Chromosom mit oc , das Y-Chromosom mit Ab markiert war. Bei $n=791$ ergab sich ein Austausch von $1,77 \pm 0,42\%$ zwischen Ab und oc . Für das X-Chromosomenpaar bzw. die homologen Abschnitte des X- und des Y-Chromosoms ist also der Austausch im weiblichen Geschlecht nur etwa 6mal häufiger als im männlichen Geschlecht.

Megaselia scalaris folgt demnach auch der Haldaneschen Regel, daß im Falle von Unterschieden in den Austauschwerten zwischen den beiden Geschlechtern stets das heterogametische Geschlecht die geringeren Werte zeigt. Die Erscheinung, daß das Verhältnis zwischen den Austauschwerten in beiden Geschlechtern für verschiedene Koppelungsgruppen bzw. verschiedene Chromosomensegmente ein verschiedenes sein kann, ist auch bei anderen Objekten ermittelt worden, z. B. bei der Maus. Ob dafür eine allgemeine Erklärung gefunden werden kann, etwa aus der Entfernung dieser Segmente vom Kinetochor oder aus der Beziehung zwischen der theoretischen und der realen Chromosomenlänge, läßt sich wohl noch nicht entscheiden. Unter den Brachyceren ist bisher hauptsächlich der Typus verschiedener *Drosophila*-Arten bekannt geworden, bei denen der Austausch im männlichen Geschlecht praktisch vollständig unterdrückt ist. Die Phoriden scheinen sich hier anders zu verhalten. Unter den Nematoceren dürfte der Austausch in beiden Geschlechtern ziemlich allgemein verbreitet sein, wie schon aus der Feststellung von Chiasmen in beiden Geschlechtern bei mehreren Nematoceren-Arten hervorgeht.

Die zuletzt geschilderten 2 Versuche zur Ermittlung der Austauschwerte zwischen Ab und oc im männlichen Geschlecht gestatten auch Aussagen über die Austauschvorgänge zwischen Ab und dem „Geschlecht“, zwischen oc und dem „Geschlecht“ und über den Doppelaustausch zwischen Ab , oc und dem „Geschlecht“, sind also durch Einführung eines hypothetischen „Locus“ für das „Geschlecht“ als Dreipunktversuche zu verwerten. Dabei ergab sich ein zunächst überraschender Widerspruch zu den Ergebnissen von ONDRASCHEK (1953), die einen Austauschwert von $1,13 \pm 0,25\%$ zwischen oc und dem „Geschlecht“ angibt, während hier Austauschwerte von annähernd 50% zwischen oc und dem „Geschlecht“ vorliegen. Um diesen Widerspruch zu klären, wurde zunächst der Versuch von ONDRASCHEK $\text{♀ } oc/oc \times \text{♂ } oc/+$ wiederholt. Es ergab sich ein Austausch von $1,12 \pm 0,28\%$, also eine volle Übereinstimmung mit dem damaligen Resultat. Nach Einführung eines mit oc markierten Y-Chromosoms und Kreuzung $\text{♀ } oc/oc \times \text{♂ } +/oc$ ergab sich jedoch ein Austausch von $50,2 \pm 2,3\%$ zwischen oc und dem „Geschlecht“. Das gleiche gilt für die Austauschwerte zwischen Ab und dem „Geschlecht“. Bei Verwendung eines normalen Y-Chromosoms ergab sich aus der Kreuzung $\text{♀ } + oc/+ oc \times \text{♂ } Ab +/+ +$ ein Wert von $2,92 \pm 0,68\%$ zwischen Ab und dem „Geschlecht“. Im Dreipunktversuch mit einem mit Ab markierten Y-Chromosom betrug jedoch der Austausch zwischen Ab und dem „Geschlecht“ $49,31 \pm 1,8\%$ und im Dreipunktversuch mit einem durch oc markierten Y-Chromosom betrug er $48,47 \pm 0,95\%$. In Tabelle 1 sind die Austauschwerte zwischen

oc und dem „Geschlecht“ bzw. *Ab* und dem „Geschlecht“ aus den genannten Versuchen nochmals verglichen.

Zur Erklärung dieser Widersprüche kann man annehmen, daß in den zu den Versuchen verwendeten normalen Y-Chromosomen stets ein C-Faktor vorhanden war, der den Austausch in dem Bereich zwischen dem geschlechtsbestimmenden Anteil des Y-Chromosoms und dem Segment mit den Loci *Ab* und *oc* stark blockiert hat, während er in den mit *Ab* oder *oc* markierten Y-Chromosomen gefehlt hat. Wahrscheinlich war die Überführung der mutierten Loci *Ab* und *oc*, die ursprünglich im X-Chromosom aufgetreten waren, in ein Y-Chromosom überhaupt nur dadurch möglich, daß dieses Y-Chromosom keinen C-Faktor enthielt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser C-Faktor eine Inversion ist, die in den meisten natürlichen Y-Chromosomen vorhan-

Tabelle 1

	Normales Y-Chromosom	<i>oc</i> -markiertes Y-Chromosom	<i>Ab</i> -markiertes Y-Chromosom
Austausch <i>oc</i> — „Geschlecht“ in %	$1,13 \pm 0,25$ $1,12 \pm 0,28$	$49,20 \pm 0,95$	$50,32 \pm 1,8$
Austausch <i>Ab</i> — „Geschlecht“ in %	$2,92 \pm 0,68$	$48,47 \pm 0,95$	$49,31 \pm 1,8$

den ist. Es wäre auch denkbar, daß bei Einführung von *Ab* und *oc* in das Y-Chromosom diese Inversion ausgetauscht wurde und auf diese Weise die mit *Ab* und *oc* markierten Y-Chromosomen inversionsfrei geworden sind. Vielleicht beruht auf dem dadurch bedingten Heterosisverlust die schwache Vitalität der Männchen mit diesen markierten Y-Chromosomen. BEERMANN (1953, 1955) hat für *Chironomus tentans* derartige an das funktionelle Y-Chromosom gebundene und in natürlichen Populationen weit verbreitete Inversionen nachgewiesen. Bei *Megaselia scalaris* wäre demnach ein chromosomaler Polymorphismus anzunehmen, wie er bei den verschiedensten Diptereengruppen verbreitet ist (letzte Zusammenstellung bei MAINX 1956). Leider sind die Phoriden zytologisch so ungünstige Objekte, daß es bisher nicht gelungen ist, den zytologischen Nachweis für diese Annahmen zu erbringen.

Im übrigen lassen sich die oben angeführten Dreipunktversuche mit Austausch im männlichen Geschlecht für die Prüfung des Doppelaustausches und der relativen Lage der beteiligten Loci verwerten. Wenn man die Ergebnisse der Versuche $\text{♀} + \text{oc}/+ \text{oc} \times \text{♂ } Ab/+ + \text{oc}$ und $\text{♀} + \text{oc}/+ \text{oc} \times \text{♂} + \text{oc}/Ab +$ zusammenfaßt, so erhält man bei $n = 3539$:

Nichtaustausch	$50,01 \pm 0,84\%$
Austausch <i>oc</i> —„Geschlecht“	$49,45 \pm 0,84\%$
Austausch <i>Ab</i> —„Geschlecht“	$48,12 \pm 0,84\%$
Austausch <i>Ab</i> — <i>oc</i>	$1,33 \pm 0,19\%$
Doppelaustausch „Geschlecht“— <i>Ab</i> — <i>oc</i>	$0,54 \pm 0,12\%$

Die Differenz zwischen den beiden individuenärmsten Klassen ist mit $0,79 \pm 0,23\%$ statistisch gesichert. Die Reihenfolge der Loci auf der theoretischen Chromosomenkarte ist: „Geschlecht“—*Abrupt—occhi chiari*. Die vorläufige map-distance zwischen dem „Geschlecht“ und *oc* ist 50,53. Die zu erwartende Größe des Doppelaustausches ist $(48,12 + 0,54) \cdot (1,33 + 0,54) = 0,91\%$. Sie ist durch Interferenz auf $0,54 \pm 0,12\%$ herabgesetzt.

Zusammenfassung

1. Bei der Phoride *Megaselia scalaris* LOEW (= *Aphiochaeta xanthina* SPEIS) kommt Faktorenaustausch in beiden Geschlechtern vor. Für die Zone der Loci *y* und *sa* im III-Chromosom ist die Austauschhäufigkeit im weiblichen Geschlecht etwa 150mal größer als im männlichen Geschlecht. Für die Zone der partiell geschlechtsgebundenen Loci *oc* und *Ab* ist der Austausch zwischen den beiden X-Chromosomen im Weibchen nur 6mal häufiger als der zwischen dem X- und dem Y-Chromosom im Männchen.

2. Im Y-Chromosom ist die Reihenfolge der Loci: „Geschlecht“—*Abrupt*—*occhi chiari* anzunehmen.

3. Das normale Y-Chromosom führt einen C-Faktor, der die Austauschvorgänge zwischen X- und Y-Chromosom stark blockiert. Die mit *Ab* oder mit *oc* markierten Y-Chromosomen sind frei von diesem Faktor. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine für das Y-Chromosom spezifische Inversion.

Den Herren Prof. CH. TOKUNAGA und Dr. H. SCHMITZ S. J. sei für die Überlassung von Stämmen, Herrn Prof. F. MAINX für seine Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit gedankt.

Literatur

BEERMANN, W.: Chromosomenpolymorphismus und Bastardierung zweier *Chironomus*-Arten. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Freiburg 1952. Zool. Anz. Suppl. **17**, 290—295 (1953). — Cytologische Analyse eines *Camptochironomus*-Artbastards. I. Chromosoma (Berl.) **7**, 198—259 (1955). — MAINX, F.: Der chromosomale Strukturpolymorphismus natürlicher Populationen als Problem der Genetik und der Evolution. Novant'Anni delle Leggi Mendeliane, 425—453. Roma 1956. — ONDRASCHEK, H.: Vererbungsstudien an *Aphiochaeta xanthina* SPEIS (*Phoridae*). Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 347—353 (1953). — TOKUNAGA, CH.: Genetic studies on *Aphiochaeta* sp. I—IV. Jap. J. Genet. Suppl. **2**, 69—74 (1949); **24**, 128—138 (1950); **26**, 31—40, 119—124, 125—128 (1951); **27**, 38—47, 100—106 (1952).

ROBERT SPRINGER, Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien IX,
Schwarzspanierstraße 17

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ÜBER DEN ERBGANG DES *CRUCIATA*-MERKMALS DER *OENOTHERA*

VIII. Mitteilung

VERBINDUNGEN DER *OENOTHERA ATROVIRENS*, UND RÜCKBLICK*

Von

O. RENNER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1958)

I. *Oenothera atrovirens* $\times$ *biennis*

Die Untersuchungen über den *cruciata*-Charakter sind von der streng *cruciata*-ten *Oe. atrovirens* ausgegangen (1937), und sie kehren jetzt zu dieser Art zurück. Die wichtigste Verbindung, *Oe. (atrovirens* $\times$ *biennis*) *pingens* $\cdot$ *rubens* (= *pictirubata*) bildet in der Meiose einen Ring von 10 und einen von 4 Gliedern; diese 4 Chromosomen sind 1.2, 2.10, 10.13, 13.1 (BAERECKE für *subpingens* aus *Oe. silesiaca*, S. 73). In der F_2 möchte man danach Individuen mit 2 freien Paaren erwarten, aber solche sind nicht gefunden worden (6 F_2 -Pflanzen von Dr. HUBERT ZIEGLER 1950 untersucht), die Gonen mit Mischkombinationen sind also nicht lebensfähig, wie bei *Oe. biennis*. Dem entspricht, daß in den Phänotypen der F_2 keine Spaltung sichtbar wird, abgesehen von sehr geringfügiger Variation in der Blütengröße, und daß der Pollen sehr viele ganz leere Körner enthält.

1. Die erste Bastardgeneration

Wie früher (RENNER 1937, RENNER und SENSENHAUER 1942) waren in F_1 ganz normalkronige und *cruciata* Individuen von *pictirubata* (Abb. 1) ungefähr



Abb. 1. *Oe. (atrovirens* $\times$ *biennis*) *pictirubata* F_1 , normalkronig und *cruciata*. 1953/15

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

wie normalkronige F_1 -Individuen verhielten. Auch in F_3 kamen noch normalkronige Pflanzen vor. Der intermediäre Zustand ist nicht festzuhalten; die Nachkommen pflegen zur Hauptsache *cruciat* zu sein. Tabelle 1.

3. Analyse der Eizellen der *pictirubata*

Früher wurde durch Kreuzung mit *Lamarckiana subcruciata* nachgewiesen, daß die Eizellen der normalkronigen *pictirubata*, schon der F_1 , so gut wie ausschließlich *Cr-pingens* enthalten (RENNER und SENSENHAUER Nr. 94 bis 100), die der *cruciata* *pictirubata* größtenteils *cr-pingens* (ibid. Nr. 112 bis 114). Dieses Verfahren wurde einige Male wieder angewendet, aber viel häufiger wurden *cr sp-blandina* großblütig (Abb. 2, 3) und *cr sp-Hookeri* kleinblütig als Väter verwendet (vgl. Mitt. VI und VII). Die Ergebnisse waren etwas wechselnd, aber im großen und ganzen ließ sich der frühere Befund bestätigen, und die Verwendung von *blandina* und *Hookeri* hat den Vorteil, daß auch alle *rubens* enthaltenden Zygoten der aus *biennis* München gewonnenen *pictirubata* (*rubens* von *biennis sulfurea* wird in den Embryosäcken nicht aktiv) erfaßt werden. Dabei stellt sich heraus, daß auch *rubens* in der *cruciata* *pictirubata* in den *cr*-Zustand übergegangen ist, in der normalkronigen wohl *Cr* ist, aber durch das nicht sehr starke *cr* von *cr-blandina* sich verhältnismäßig leicht zu *cr* konvertieren läßt oder zum mindesten gegen dieses sich rezessiv verhält. Tabelle 2.



Abb. 3. *Oe. (pictirubata F₁ cruciat × sp cr co-blandina) pictilevata cruciat. 1953/44*

Daß die Kreuzung *cr-pictirubata* × *atrovirens* nur *cruciata pictiflexa* und *rubiflexa* liefert, nimmt nicht wunder. Überraschend dagegen ist, daß *Cr-pictirubata* × *atrovirens* und × *biennis cruciata* neben *cruciater* Nachkommenschaft in beträchtlicher Zahl auch normalkronige liefert. Aus der Kreuzungsfolge (*cr* × *Cr*) *Cr* × *cr* pflegen ja sonst zur Hauptsache *cruciata* Nachkommen hervor-

Tabelle 2

a) *pictirubata* × *cr* sp *ev-blandina*

	<i>pictilevata</i>			<i>rubilevata</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr</i> F ₁ 50/40	10	1	2	9	1	9
52/55	76	0	3	11	0	5
52/56	96	2	2	14	3	6
53/25	41	6	10	3	2	2
53/67	54	5	22	10	1	5
53/83	40	5	0	6	2	0
<i>Cr</i> F ₂ 51/64	42	3	1	7	1	0
Summe	359	22	40	60	10	27
<i>cr</i> F ₁ 51/48	0	3	29	0	0	0
53/31	0	3	47	0	0	1
53/39	2	0	40	0	0	3
53/44	0	0	46	0	0	0
53/64	3	0	31	0	0	2
53/65	2	1	29	0	0	2
<i>cr</i> F ₂ 51/66	1	4	58	0	0	9
51/61	7	0	101	0	0	6
Summe	15	11	391	0	0	23

b) *pictirubata* × *cr* sp *Co-Hookeri*

	<i>pictihookeri</i>			<i>rubihookeri</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr</i> F ₁ 52/57	100	1	2	17	1	0
53/26	9	2	0	0	0	0
53/51	17	3	7	9	0	1
53/69	21	0	0	8	0	0
53/70	33	0	0	3	0	0
Summe	180	6	9	37	1	1
<i>cr</i> F ₁ 51/44	6	5	95	0	0	16
53/32	9	2	23	0	0	8
53/81	5	0	60	0	0	3
Summe	20	7	178	0	0	25

c) *pictirubata* × *Lamarckiana subcruciata*

	<i>pictilacta</i> + <i>pictivelutina</i>			<i>rubivelutina</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr</i> F ₂ 53/73	77	0	0	1	0	0
<i>cr</i> F ₁ 51/50	2	2	50	0	0	3
<i>cr</i> F ₃ 53/75	2	1	36	1	0	0
<i>cr</i> Summe	4	3	86	1	0	3

	<i>pictae</i>			<i>rubatae</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
Aus <i>Cr</i> , Summe a + b + c	616	28	49	98	11	28
Aus <i>cr</i> , Summe a + b + c	39	21	655	1	0	51

Tabelle 3

a) *pictirubata* × *atrovirens*b) *pictirubata* × *biennis cruciata*

<i>pictirubata</i>	<i>pictiflora</i>			<i>rubiflora</i>			<i>pictirubata</i>	<i>pictirubata</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>		<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr</i> F ₁ 53/24	4	0	39	1	0	4	<i>Cr</i> F ₁ 43/81	1	5	26
53/35	0	2	4	0	0	0	53/36	21	14	5
53/41	15	9	7	0	0	0	53/50	12	4	11
53/48	3	3	40	4	2	2	54/5	10	36	31
53/56	0	2	52	0	0	3	<i>Cr</i> F ₂ 52/54	18	4	0
53/61	5	1	31	1	1	1				
<i>Cr</i> F ₂ 51/57	0	16	32	3	0	2	Summe	62	63	73
52/53	28	4	0	0	0	0				
<i>Cr</i> Summe	55	33	205	6	3	12				
<i>cr</i> F ₁ 51/49	0	0	25	0	0	0				
53/30	0	0	66	0	0	5				
53/55	0	0	20	0	0	2				
53/59	0	0	53	0	0	9				
<i>cr</i> F ₂ 51/63	0	0	33	0	0	14				
<i>cr</i> Summe	0	0	197	0	0	30				

zugehen (IV, S. 594). Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht.

Die Schwächung des *cr* in *pingens* der *cruciata* *pictirubata* wurde früher bei der Rückkreuzung mit *Cr-biennis* gefunden. Neuerliche Prüfung

brachte dasselbe Ergebnis, und Verbindung mit anderen normalkronigen Sippen zeigte dieselbe Erscheinung, wie die Tabelle 4 ausweist.

Daß normalkronige *pictirubata* mit *Cr*-Sippen gekreuzt nur *Cr*-Nachkommen bringt, versteht sich danach von selbst. Hier ist nicht ein einziges Individuum gefunden worden, das die Herkunft von der *cruciata* *atrovirens* verraten würde (Tabelle 5).

4. Analyse des Pollens der *pictirubata*

Der Pollen der *pictirubata* wurde durch Kreuzung mit den gleichen schwach *cruciata* Sippen als Müttern geprüft, die oben als Väter verwendet waren, und es ergibt sich wieder, daß der *rubens*-Komplex der normalkronigen *pictirubata* vorzugsweise *Cr* enthält, der der *cruciata* nur *cr* (Abb. 4). Die immerhin beträchtliche Häufigkeit *cruciata* Nachkommen aus *cr* × *Cr* möchte ich durch die Annahme erklären, daß das geschwächte *Cr* von *rubens* bei dem neuerlichen Zusammentreffen mit einem wenn auch nicht sehr starken *cr* manchmal unterliegt. Tabelle 6.

Nach Analogie mit dem Ergebnis der Verbindung (*atrovirens* × *Cr-biennis*) *cr-pictirubata* × *Cr-biennis* möchte man erwarten, daß bei der Kreuzung

Tabelle 4. *cr-pictirubata* gekreuzt mit *Cr*-Sippen; nur die *pictae* sind aufgeführt, weil wenige (oder keine) *rubatae* auftreten

<i>pictirubata</i>	gekreuzt mit	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
51/45 F ₁	<i>biennis</i>	100	0	0
54/6 F ₁	<i>biennis</i>	48	3	0
43/56 F ₂	<i>biennis</i>	44	1	2
52/68 F ₃	<i>biennis</i>	58	0	0
43/75 F ₁	<i>franciscana</i>	9	0	1
43/146 F ₁	<i>Hookeri</i> Stand.	31	1	0
44/138 F ₁	<i>Hookeri</i> klbl.	27	1	2
44/150 F ₃	<i>Hookeri</i> klbl.	44	1	0
44/136 F ₁	<i>Lamarckiana</i> Stand.	26	0	0
44/151 F ₃	<i>Lamarckiana</i> Stand.	24	0	0
44/137 F ₁	<i>suaveolens</i> Stand.	27	0	0
	Summe	438	7	5

Tabelle 5. *Cr-pictirubata* gekreuzt mit *Cr*-Sippen

F ₁ × <i>albivelutina</i> , 36/202	40	<i>Cr-pictivelutina</i>
F ₁ × <i>franciscana</i> , 43/78	60	<i>Cr-pictifranciscana</i>
F ₁ × <i>Hookeri</i> klbl., 44/135	27	<i>Cr-pictihookeri</i>
F ₁ × <i>Hookeri</i> klbl., 43/155	86	<i>Cr-pictihookeri</i>



atrovirens $\times$ (*atrovirens* $\times$ *Cr-biennis*) *Cr-pictirubata* lauter *cr-pictirubata* entsteht. Aber das ist nicht der Fall. Das *Cr* von *rubens* ist in der *Cr-pictirubata* so stark, daß es sich in etwa einem Fünftel der Individuen gegen das *cr* von *pingens* durchsetzt. Die Kreuzung *atrovirens* $\times$ *cr-pictirubata* dagegen liefert überhaupt nur cruciate *pictirubata*, wie nicht anders zu erwarten. Tabelle 7.

Die Kreuzung *biennis* normalkronig (es wurde *biennis sulfurea* verwendet, weil die sattgelbe Kronenfarbe bestätigt, daß alle Individuen wirklich Bastarde sind) mit *Cr-pictirubata* F_1 brachte neben $150 + 39 + 59 + 79 = 327$ *Cr-biennis* nur eine intermediäre Pflanze und keine cruciate.

Abb. 4. *Oe. (Lamarckiana subcruciata* $\times$ *pictirubata* F_1 cruciat) *velorubata* cruciat. 1953/34

Tabelle 6. *Schwach cruciate Mütter bestäubt mit dem Pollen von pictirubata*

a) <i>cr sp co — blandina</i> $\times$ <i>pictirubata</i>				c) <i>Lamarckiana subcruciata</i> $\times$ <i>pictirubata</i>			
<i>pictirubata</i> ♂	<i>levorubata</i>			<i>pictirubata</i> ♂	<i>velorubata</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>		<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr F₁</i> aus 51/51	7	0	3	<i>Cr F₁</i> aus 53/28	45	2	1
<i>Cr F₁</i> aus 52/64	4	8	8	53/38	49	1	4
<i>Cr F₁</i> aus 52/65	8	2	3	53/52	29	1	22
<i>Cr F₂</i> aus 51/58	32	6	3	Summe	123	4	27
<i>Cr</i> Summe	51	16	27	<i>cr F₁</i> aus 53/34	0	0	37
<i>cr F₂</i> aus 51/67	0	0	4	53/46	0	0	61
b) <i>cr sp Co — Hookeri</i> $\times$ <i>pictirubata</i>				Summe	0	0	98
<i>pictirubata</i> ♂	<i>hookerirubata</i>			Summe a + b + c aus <i>Cr</i>	250	24	76
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	Summe a + c aus <i>cr</i>	0	0	102
<i>Cr F₁</i> aus 52/66	25	3	2	d) <i>velorubata</i> selbstbestäubt			
53/57	51	1	20	54/14 <i>velorubata Cr</i> aus 58/38	57	1	7
Summe	76	4	22	54/13 <i>velorubata cr</i> aus 53/34	0	0	57

Der Pollen der *cruciata pictirubata*, in F_1 wie in F_3 , erwies sich als dezidiert *cr*, denn die Kreuzung mit *Cr-biennis sulfurea* als Mutter brachte ungefähr das

Tabelle 7

<i>atrovirens</i> $\times$ <i>pictirubata</i> F_1		
<i>pictirubata</i> δ	<i>pictirubata</i>	
	<i>Cr</i>	<i>cr</i>
<i>CrF</i> ₁ 44/130	3	23
52/59	5	4 ¹
53/37	11	60
53/42	3	4
Summe	22	91
<i>cr F</i> ₁ 53 33	0	10
53/45	0	22
Summe	0	32

¹ Pflanze sektorial *Cr* + *cr*.

Tabelle 8. *Cr-biennis sulfurea* $\times$ *cr-pictirubata*

<i>pictirubata</i> δ	F_1	F_1	F_1	F_2	F_3	zusammen
<i>Cr-biennis</i> .	18	25	8	30	36	117 <i>Cr</i>
<i>cr-biennis</i> .	11	13	6	26	57	113 <i>cr</i>
<i>biennis</i> int. .	0	0	0	2	1	3 int.

gleiche Ergebnis, wie wenn *biennis cruciata* als Vater gedient hätte (Tabelle 8). Aber vielleicht kommt in der gleichen Anzahl von *Cr* und *cr* zum Ausdruck, daß Rekombination eines anderen Allelenpaars, etwa der — hier kaum unterscheidbaren — *Co*-Faktoren, an der Prägung der Kronengestalt mitbeteiligt ist.

II. *Cr-pictirubata* mit *Lamarckiana*-Plasma

Die verhältnismäßig großblütige Form, aus *Oe. (atrovirens* $\times$ *Lamarckiana*) *pictilaeta* $\times$ *biennis* entstanden (RENNER 1936, S. 274; RENNER 1937a, S. 648; von SCHÖTZ als *pictirubata* Lam. viel verwendet), ist seit ihrer Entstehung bis heute in Kultur, und ihre Plastiden haben bis heute die Charaktere der *Lamarckiana* bewahrt. Ihr *pingens* besitzt ein dezidiertes *Cr*, das sich gegen das schwache *cr* einer *cr-albivelutina* immer, und gegen das recht starke *cr* von *biennis cruciata* meistens durchsetzt. Aber in einer aus der Kreuzung mit *cr-biennis* hervorgegangenen *cr-pictirubata* war das *cr* in *pingens* ebenso bestimmt auf *cr* umgestellt, wie in *pingens* von *atrovirens* das *cr* durch *Cr* von *Cr-biennis* auf *Cr* umgestellt werden kann. Die folgenden Protokolle geben genauere Daten.

pictirubata Lam. $\times$ *biennis cruciata*: 117 *pictirubata*, 110 *Cr*, doch größtenteils mit etwas defekten Petala, 4 von *Cr* bis *cr* variierend, nur 3 ganz *cruciat*; 53/22.

pictirubata Lam. $\times$ *cr-R-albivelutina* (aus 46/121): 39 *Cr-pictivelutina* ohne Defekte; 49/95.

pictirubata Lam. $\times$ *atrovirens*: 11 weiße Sämlinge (mit *Lamarckiana*-Plastiden), 17 grüne, meist mit etwas Weiß, im Beet 14 grüne *pictiflexa*, teils *Cr*, teils *cr*, 1 intermediär; 44/124.

cr-pictirubata aus 53/22 selbst: 60 streng *cruciate pictirubata*; 54/9.

cr-pictirubata 53/22 $\times$ *cr sp co-blandina*: 160 *pictilevata*, 156 *cr*, 3 intermediär, 2 *Cr*; 54/10.

Cr-pictivelutina aus 49/95 selbst: 104 *Cr-pictivelutina*, keine *cr*; 50/44.

III. *Oenothera silesiaca* $\times$ *biennis cruciata*

Oe. silesiaca besitzt einen Eizellenkomplex, der dem *pingens* der *Oe. atrovirens* äußerst ähnlich ist, bis auf den Besitz von *Cr* statt *cr*, und der den Namen *subpingens* bekommen hat (RENNER 1943); der Pollen ist mit dem der *Oe. parviflora* fast identisch und führt den Namen *subcurvans*.

Oe. (silesiaca $\times$ *biennis cruciata*) *subpictirubata* bildet in der Meiose zwei Ringe von 10 bzw. 4 Gliedern. Die F_1 war fast nur normalkronig; unter 33 Pflanzen war nur eine *cruciat*, aber die *Cr* waren doch teilweise etwas defekt (BAERECKE S. 88, 42/234 und 43/374). Eine *Cr*-Pflanze wurde noch einmal mit *biennis cruciata* gekreuzt und lieferte 31 *cruciate*, keine *Cr* (44/146); das ist das genaue Gegenstück zu dem Ausfall der Kreuzung (*atrovirens* $\times$ *Cr-biennis*) *cr-pictirubata*

$\times Cr$ -*biennis*. In den *cr*-Pflanzen dieser iterativen Kreuzung erwies sich *subpingens* als dezidiert cruciat, wie die in Tabelle 9 zusammengestellten Kreuzungen zeigen.

Daß in den beiden letzten Kreuzungen die *Cr*- und die *cr*-Nachkommen ungefähr gleich häufig sind, kann Zufall sein. Es ist aber auch möglich, daß eine echte 1:1-Spaltung vorliegt, wobei nicht Rekombination nach *Cr*-*cr* stattfindet, sondern nach den *Co*-Faktoren, und im Zusammenhang damit das *Cr*

des Vaters bald dominiert, bald rezessiv wird.

Bei Selbstung setzten die F_1 -Pflanzen keine Samen an. Die F_2 aus 46/88 verhielt sich im ersten Jahr ebenso, eine 2jährige *cr*-Pflanze brachte bei Selbstung 21 streng cruciate Kinder mit grünlich gestreiften Kronblättern; 49/56. Einige Kreuzungen von *Cr*- und *cr*-Pflanzen dieser F_2 brachten nichts Unerwartetes. Tabelle 10

Tabelle 9. *cr*-*subpictirubata* gekreuzt mit *cr* und *Cr*

gekreuzt mit	<i>subpicta</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>cr</i> - <i>Lamarckiana subcruciata</i> , 46/86	0	0	34
<i>Cr</i> - <i>biennis sulfurea</i> , 46/88	18	0	17
<i>Cr</i> - <i>Hookeri</i> klbl., 46/87	10	2	15

Tabelle 10. *subpictirubata* F_2 *cr* und *Cr* gekreuzt mit *cr* und *Cr*

	<i>subpicta</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>subpictirubata cr</i> $\times$ <i>Cr</i> - <i>Hookeri</i> , 49/48	34	1	4
<i>subpictirubata Cr</i> $\times$ <i>Cr</i> - <i>Hookeri</i> , 49/57	19	0	0
<i>subpictirubata Cr</i> $\times$ <i>cr</i> - <i>biennis</i> , 48/81	0	2	23

Die als *Cr* $\times$ *cr* entstandene *subpictirubata* verhält sich also ebenso wie die als *cr* $\times$ *Cr* entstandene *pictirubata*.

IV. *Oenothera atrovirens* $\times$ *suaveolens*

Die Kreuzung verhält sich in allen Stücken ähnlich wie die mit *Oe. biennis*. Die *pictiflava* war in den ersten F_1 -Familien fast ganz normalkronig (RENNER 1937, Nr. 863—865, in den Jahren 1924—1931), dann vorzugsweise cruciat (l.c. Nr. 866, in 1933 und 1934), später waren *Cr* und *cr* etwa gleich häufig (RENNER und SENSENHAUER Nr. 52, in 1942), zuletzt waren wieder die normalkronigen zahlreicher (26 *Cr*, 5 int., 9 *cr*; 43/52). — Der Bastard hat einen 12er-Ring und ein freies Paar, 11.12.

Tabelle 11. *cr*-*pictiflava* F_1 gekreuzt mit *Cr*-*Sippen*

	<i>picta</i>			<i>flava</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
43/168, $F_1 \times biennis$ München	58	0	11	14	0	2
44/144, $F_1 \times Cr$ - <i>Hookeri</i> klbl.	16	0	2	22	1	2
43/163, $F_1 \times suaveolens$	63	2	11	—	—	—
44/209, $F_2 \times suaveolens$	12	1	4	—	—	—
Summe	149	3	28	36	1	4
Summe <i>picta</i> + <i>flava</i>	185	4	32			

Bei Selbstung der *pictiflava* entstehen wenige keimfähige Samen. Aufgezogen wurden nur 5 *Cr* aus *Cr* (1925 und 1934) und 6 *cr* aus *cr* (44/143); eine intermediäre Pflanze brachte 9 *Cr*, 1 int. und 5 *cr* (34/144).

Bei Kreuzung der *Cr-pictiflava* mit *atrovirens* waren unter 32 Pflanzen nur 2 *flaviflexa* intermediär, die übrigen 30, *picta* wie *flava*, waren *cruciat* (44/140); *cr-pictiflava* $\times$ *atrovirens* gibt natürlich nur *cruciate*, nicht nur *picta* sondern auch *flava* (RENNER 1937, Nr. 956). Die Kreuzung der *cr-pictiflava* mit *Cr*-Sippen zeigt wieder die Schwächung des *cr* im Bastard. Tabelle 11.

V. *Oe. atrovirens* $\times$ *Lamarekiana* Standard

Die Kreuzung brachte wie früher (1937, Nr. 854—857) unter 54 Pflanzen wenige *pictilaeta*, teils *Cr*, teils *cr*, teils intermediär, und viele *pictivelutina*, mehr *cr* als *Cr*, einige intermediär; 43/110.

1. *pictilaeta*

Die Verbindung verhält sich ähnlich wie *pictirubata*, mit der sie auch konstitutionell fast identisch ist: die Meiosekonfiguration ist $10 + 4$. Normalkronige



Abb. 5. *Oe. (atrovirens* $\times$ *Lamarekiana)* *pictilaeta* F_2 aus *cruciat*er F_1 (normale Petala nicht dargestellt). 1939/30. $\frac{5}{8}$ der natürlichen Größe

Pflanzen der F_1 bringen bei Selbstung nur *Cr*-Nachkommen (1937, Nr. 960, 961), *cruciate* spalten *Cr* ab (Nr. 962; von 32 Pflanzen in 39/30 waren die meisten *cr* oder intermediär, Abb. 5. 7 waren *Cr*; 42 Pflanzen in 44/155 aus 43/110, darunter 12 *Cr*). Maßgebend sind wieder die Kreuzungen mit einer schwachen *cr*-Sippe. Aus *Cr-pictilaeta* $\times$ *Lamarckiana subcruciata* gingen fast nur *Cr*-Typen hervor, *pictilaeta*, *pictivelutina*, *Lamarckiana* — *gaudens* · *velans*. Die reziproke Verbindung brachte nur *cruciate* *Lamarckiana* = *velans* · *gaudens*, aber mit verhältnismäßig breiten Kronblättern. — In den Eizellen ist *gaudens* häufiger gefunden als *pingens*; bei Kreuzungen mit *Hookeri* abgeleitet kleinblütig entstanden $10 + 13$ *pictihookeri* und $22 + 23$ *laetihookeri* (1944/156 und 322).

2. *pictivelutina*

Pingens und *velans* haben die Chromosomen 3.4, 5.8 und 11.12 gemeinsam (BAERECHE S. 73 für *subpicta* aus *silesiaca*). Die durch 3.4 bedingte Spaltung in *pP* und *PP* (mit braunrotem Kelch) bei Selbstung ist auffällig; *pp* tritt nicht auf, weil *p-velans* im Pollen nicht aktiv. Die Spaltung nach 5.8 und die

nach 11.12 sind nicht erfaßt. Normalkronige F_1 brachte bei Selbstung wie früher (1937, Nr. 980, 986) nur ebensolche F_2 (32 Pflanzen, 44/157). Die Rückkreuzung *atrovirens* $\times$ *Cr-pictivelutina* brachte zur Hauptsache cruciate, wenige *Cr-pictivelutina* (9 extrem *cr*, 1 *Cr*, 44/159, ähnlich wie 1937 Nr. 984); es ist die bekannte Schwächung von *Cr* beim zweiten Zusammentreffen mit *cr*. Cruciate *pictivelutina* spaltet in F_2 normalkronige ab (16 *cr*, 8 *Cr*, 44/160, beide *p P* und *P P*). Die Kreuzung *cr-pictivelutina* $\times$ *Lamarckiana subcruciata* brachte mehr *cr*- als *Cr*-Nachkommen (*pictilaeta* 8 *cr*, 2 int., 1 *Cr*, *pictivelutina* 1 *cr*, und *velans · gaudens* 13 *cr*, 6 *Cr*; 44/163). Die Kreuzungen von *cr-pictivelutina* mit *Cr*-Sippen, nämlich *Lamarckiana* Stand., *suaveolens* Stand. und *Hookeri* abgeleitet kleinblütig (aus 43/188) lieferten nur *Cr*-Nachkommen (20 + 33 + 40 Pflanzen, 44/162, 164, 161). — In den Eizellen ist *velans* häufiger angetroffen als *pingens*; es waren z. B. 5 *pictiflava* neben 28 *velutiflava*. — Die Maße der Petala variierten in den Folgegenerationen nicht so auffällig wie sonst bei Kreuzung von *Oe. Lamarckiana* mit kleinblütigen Sippen.

VI. *Oenothera atrovirens* $\times$ *Lamarckiana subcruciata*

Die Verbindung der beiden cruciaten Sippen liefert natürlich nur streng cruciate Nachkommen; es waren 66 *laeta*, 9 *velutina*, mit schmalen spitzen Petala; 43/182. Eine solche *cr-pictilaeta* mit *biennis* München gekreuzt brachte 17 *pictirubata*, 14 *Cr*, 3 *cr*; 44/52. Das Ergebnis ist nicht ganz klar, aber die wahrscheinlichste Deutung ist die, daß das *pingens* im *cr*-Bastard sich noch so verhalten hat wie in der *atrovirens*. — Vgl. dazu I. Mitt., Nr. 851, 991, 992.

VII. *Pictihookeri* = *pingens* · ^{h} *Hookeri*

Pingens und ^{h} *Hookeri* haben die Chromosomen 3.4 und 11.12 gemeinsam, die übrigen Chromosomen bilden einen 10er-Ring. Bei Selbstung spaltet die *pictihookeri* in *p P* und *P P*, weil *P* von *Hookeri* in 3.4 liegt; *p p* erscheint nicht, weil $p\text{-}^h$ *Hookeri* im Pollen nicht aktiv wird. *Hookeri*-Homozygoten treten sehr wenige auf und sind schwach, wohl weil wegen des *atrovirens*-Plasma. Der Austausch der 11.12-Chromosomen hat nicht erfaßt werden können.

1. *cr-pingens* · *Cr*- ^{h} *Hookeri* aus *atrovirens* $\times$ *Hookeri* Standard

In F_1 sind die Kronen meist normal, weniger cruciat, wenige intermediär (1937, Nr. 852, 853). Die F_2 aus *Cr*- F_1 war ganz *Cr* (Nr. 967), die aus *cr*- F_1 war teils *cr*, teils *Cr* (Nr. 968, 964). Kreuzung von *Cr-picta* mit *atrovirens* ♂ brachte lauter *cr-pictiflexa* (Nr. 966), die mit *cr-biennis* ♂ lieferte *pictirubata* *Cr*, *cr* und intermediär (Nr. 965). — Die seinerzeit geäußerte Vermutung, daß die *cr-picta* der F_1 chimärisch war, wird nicht aufrechterhalten, es kann die gewöhnliche Labilität vorgelegen haben.

2. *pingens* · *cr* sp *Co*- ^{h} *Hookeri* (aus *atrovirens* $\times$ *cr* sp *Co*-*Hookeri*, vgl. Tabelle 2b)

Bei Selbstbestäubung solcher *pictihookeri* wird die Gestalt der Petala von den *Cr*-Individuen streng reproduziert, von den *cr*-Pflanzen meist ebenso. Die Kreuzung mit *blandina* förderte etwas mehr *Hookeri*-Eizellen zutage als die Selbstung.

Cr-pictihookeri selbst aus 52/57: 50 + 5 + 81 + 8 = 144 *Cr*, keine *cr*; *Cr-pictihookeri* selbst aus 53/70: 54 + 32 = 86 *Cr*, keine *cr*; *cr-pictihookeri* selbst aus 52/57, 53/51: 39 *cr*, 3 intermediär, und 39 *cr*, zusammen 78 *cr* und 3 intermediär, keine *Cr*.

Cr-pictihookeri (aus 52/57) $\times$ *cr sp co-blandina*: 67 *Cr-pictilevata* ohne Defekte, *p P* und *P P*, keine *hookerilevata*. 53/138.

Cr-pictihookeri (aus 52/57) $\times$ *cr sp co-blandina*: 97 *pictilevata*, *p P* und *P P*, 92 *Cr*, 4 intermediär, 1 *cr*; 17 *hookerilevata*, 16 *Cr*, 1 intermediär bis fast *cruciat*; ^h*Hookeri* ist aus *cr* zu *Cr* konvertiert; 53/140.

VIII. *Pietifranciscana* = *pingens* $\cdot$ ^h*franciscana*

Die verwendete *franciscana* von DAVIS ist der *Hookeri* sehr ähnlich, in der Segmentanordnung dieser gleich. Die Kreuzung *atrovirens* $\times$ *franciscana* hatte viel mehr *cruciate* als normalkronige Nachkommen gebracht (Mitt. III, Nr. 48, 41/127). In der *F*₂ traten neben kräftiger *picta* wenige schwache *franciscana* auf, dazu Spaltung in *p P* und *P P*. Die Abkömmlinge der *Cr-picta* waren alle *Cr*, *picta* wie *franciscana* (99 + 21 Pflanzen, 43/69 und 43/66), die der *cr* waren teils *cr*, teils *Cr*, auch sektorial *Cr* + *cr* (33 Pflanzen, 43/61).

IX. *Pictilevata* aus *Cr-pictirubata* $\times$ *cr sp co-blandina*

Pingens und *levans* haben die Chromosomen 3.4 und 11.12 gemeinsam, die übrigen Chromosomen bilden einen 10er-Ring. Die Spaltung nach *p P* und *PP* ist ebenso auffällig wie bei *pictihookeri*, dazu erscheint die *blandina* als nicht gar zu schwache *sp*-Form, und recht kräftig ein *blandina*-ähnlicher *Sp*-Typus, als B-Typus bezeichnet, eine *picta*, die in den Eizellen das 11.12-Chromosom von *levans* besitzen muß. Das Korrelat, *levans* mit 11.12 von *pingens*, wird in den Eizellen auch zu finden sein; im Pollen werden die Zellen mit diesem Chromosom wohl inaktiviert. Der Typus B erzeugt bei Selbstung sich selbst wieder und daneben *blandina*. Die Kronenform der *pictae* ist bei Selbstung ziemlich konstant — warum der Typus B in 53/123 *cruciat* war, ist unklar —, die *blandina* ist meist *cruciat*. Die Größe der Petala variiert sehr. Tabelle 12.

Tabelle 12. *pictilevata* selbstbestäubt

	<i>picta</i>		Typus B		<i>blandina</i>	
	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	<i>cr</i>
<i>picta Cr</i> 53/121 aus 52/56	25	0	1	0	?	?
53/122 aus 52/56	30	0	3	0	2	?
53/123 aus 52/56	31	0	0	8	1	4
<i>picta cr</i> 53/77 aus 52/56	7	42	?	?	?	?
53/120 aus 52/55	0	32	0	5	0	4
Typus B <i>cr</i> 54/65 aus 53/120	0	0	0	~60	0	~25
54/66 aus 53/123	0	0	2	~30	2	~13
<i>blandina cr</i> 54/67 aus 53/123	—	—	—	—	0	105

Mit *Cr-biennis sulfurea* gekreuzt brachte *cr-pictilevata* (aus 53/44) fast nur normalkronige, nämlich 55 *Cr-pictirubata*, teils *p* teils *P*, und 10 *Cr-levorubata*, teils *P* teils *p*, 1 intermediär bis *cruciat*; 54/15.

X. *Pictipurpurata* = *pingens* $\cdot$ ^h*purpurata*

Die Verbindung bildet in der Meiose zwei Paare, 3.4 und 11.12, dazu einen 4er-Ring aus 6.9 + 8.5 und 5.6 + 9.8, und einen 6er-Ring (BAERECKE S. 73). Die Kreuzung *atrovirens* $\times$ *purpurata* hatte etwa gleich viele *Cr* und *cr*, auch einige intermediäre gebracht

(III, Nr. 50, 40/125). Die F_2 spaltet wieder in pP und PP , die auftretenden *purpurata*-ähnlichen Typen sind kräftig. Die Nachkommen einer selbstbestäubten *Cr*-Pflanze waren alle *Cr* (120 Pflanzen, 43/60), die einer cruciaten (89 Pflanzen, 43/59) waren teils *cr*, teils *Cr*, auch sektorial von *Cr* bis zu *cr* variierend.

XI. *Pictiflexa* aus *pictirubata* (oder *pictiflava*) $\times$ *atrovirens*

Die normalkronige *pictiflexa* ist, von der Gestalt der Petala abgesehen, mit *atrovirens* identisch; über das Auftreten von *Cr*- neben *cr-pictiflexa* vgl. oben Tabelle 3 und unten S. 389. In den früheren Versuchen war die *Cr*-Form bei Selbstbestäubung meist konstant (I, Nr. 895, 900; Nr. 907a aus *pictiflava*; III, Nr. 158, 159), ausnahmsweise spaltete sie cruciate ab (Nr. 901), aber hier handelte es sich um einen *Cr*-Zweig einer Pflanze, die auch *cr*-Sektoren besaß. Die cruciate Form war ebenfalls konstant (Nr. 902) oder spaltete einige *Cr* ab (Nr. 898, 903, 907c). Daß intermediär blühende Individuen oder Zweige mehrförmige Nachkommenschaft hatten, ist danach nicht verwunderlich (Nr. 899, 904; 907b). Später wurde die Nachkommenschaft einer normalkronigen *pictiflexa* (aus 52/53, oben Tabelle 3) größtenteils cruciat gefunden (46 *cr*, 13 *Cr*, 1 *cr* bis intermediär, 1 2-köpfig *Cr* + *cr*; 53/19).

Die Analyse der Komplexe auf *Cr*—*cr* war in einer größeren Zahl von Familien vorbereitet, die bei der Zerstörung des Gartens 1945 verlorengingen. Von den wenigen überlebenden sind am interessantesten die Kreuzungen zwischen einer *Cr-pictiflexa* aus *pictirubata* mit *Lamarckiana*-Plasma (44/124, oben S. 383) und einer kleinblütigen *Hookeri* mit *biennis*-Plasma (44/320; VII, S. 362). *Hookeri* $\times$ *Cr-pictiflexa* brachte 51 *hookeriflexa* (dunkelgrün weil mit *biennis*-Plasma), davon 39 *Cr*, 17 *cr* bis intermediär. Die reziproke Kreuzung brachte 82 *Cr-pictihookeri* und 1 *flexihookeri*, ebenfalls *Cr*. Der Pollen der *Cr-pictiflexa* war also teils *Cr*, teils *cr*. — Früher war durch Kreuzung von *Cr-pictiflexa* mit *Lamarckiana subcruciata* als Mutter der *flectens*-Pollen als im wesentlichen *Cr* besitzend erkannt worden (III, Nr. 160, 161).

Eine gewisse Verschiebung des Verhaltens im Lauf der Jahre ist also auch hier, ähnlich wie bei *pictirubata* (vgl. S. 389/390), zu erkennen.

XII. *Flexirubata* aus *atrovirens* $\times$ *Cr-biennis*

Für die Verbindung *flectens* · *rubens*, und ebenso für *rubens* · *flectens* aus *pictirubata* $\times$ *atrovirens*, wurde früher gefunden, daß die *cr*-Form in den Folgegenerationen konstant ist, die *Cr*-Form (noch in F_3 , später nicht mehr) cruciate abspaltet (III, S. 586—587). Das ist späterhin bestätigt worden. Zum Beispiel brachte eine *Cr-flexirubata* aus *atrovirens* $\times$ *biennis* München bei Selbstbestäubung unter 31 Pflanzen nur 12 *Cr*, aber 2 intermediäre und 17 *cr* (50/42; ähnlich wie *rubiflexa* in III, Nr. 143). Das *Cr* von *flexirubata* erwies sich (wie in III, Nr. 133 und 134) als recht schwach; *Cr-flexirubata* F_2 (aus 50/42) $\times$ *cr sp coblandina* brachte 7 *flexilevata*, meist *cr*, wenige intermediär, und 35 *rubilevata*, 34 streng cruciat, 1 intermediär, nur 1 *Cr* (51/92). Das stimmt gut zu der Inkonzanz der *Cr*-Form bei Selbstbestäubung.

XIII. *Rubihookeri* aus *pictirubata* $\times$ *cr sp Co-Hookeri* und *hookerirubata* aus *er sp Co-Hookeri* $\times$ *pictirubata*

Über das Verhalten der Verbindung von *hHookeri* mit *cr-rubens* vgl. Mitt. VII. Das *Cr-rubens* der hier behandelten Verbindungen stammt aus *biennis* München, ist also in den Eizellen aktiv. Die cruciat stumpfblättrig kleinblütige *Hookeri* stammt aus (*Hookeri* $\times$ *biennis cruciata*) *hookerirubata* und besitzt das 5 *sp cr* 6-Chromosom von *rubens*. In *rubihookeri*, also wenn *pictirubata* Mutter war, fehlten in der Nachkommenschaft aus Selbstung die *Hookeri*-Homozygoten, dagegen sind sie zahlreich bei *hookerirubata*, mit *Hookeri* als Mutter. Da beide Eltern *sp* in 5.6 besitzen, ist die Koppelung von *cr* an *sp* nicht zu beobachten. Cruciate *rubihookeri* reproduzierte sich rein, normalkronige in einem Fall ebenso, in einem anderen Fall spaltete sie cruciate ab, wohl infolge des Austausches von 5 *Cr* 6 und 5 *cr* 6. Normalkronige *hookerirubata* erzeugte größtenteils *Cr*-Nachkommen, von denen die zahlreichen *Cr-Hookeri* ihr *Cr* durch Konversion erworben haben müssen. Cruciate *hookerirubata* aus derselben Familie brachte fast nur cruciate Nachkommen; die wenigen *Cr*-Pflanzen

Tabelle 13. *rubihookeri* und *hookerirubata* selbstbestäubt

	<i>rubata</i>			<i>Hookeri</i>		
	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>	<i>Cr</i>	int.	<i>cr</i>
<i>Cr-rubihookeri</i> aus 53/51 .	10	1	5	0	0	0
53/70 .	13	0	0	0	0	0
<i>cr-rubihookeri</i> aus 51/44 .	0	0	20	0	0	0
<i>Cr-hookerirubata</i> aus 53/57	40	2	2	33	3	1
<i>cr-hookerirubata</i> aus 53/57	1	2	30	3	3	39

zen müssen auf Reversion von *cr* in *rubens* zu *Cr* zurückgehen, und daß auch *^hHookeri* dabei in Mitleidenschaft gezogen wird, ist bemerkenswert. Tabelle 13.

Besprechung und Zusammenfassung

Wie früher (Mitt. I. III) hat sich für *Oe. (atrovirens* × *biennis*) *pictirubata* = *cr-pingens* · *Cr-rubens* durch Kreuzung mit Sippen, die ein schwaches *cr* besitzen, dartun lassen, daß infolge von Konversion die normalkronigen Individuen, in *F*₁ wie in späteren Generationen, in bezug auf *Cr*, die cruciaten in *cr* homozygotisch (oder wenigstens homöozygotisch; vgl. IV, S. 602) sind. Die aus *Cr-pictirubata* mit *Lamarckiana*-Plasma × *cr-biennis* gewonnene *pictirubata* = *Cr-pingens* · *cr-rubens* verhält sich nicht anders, und ebenso die Verbindung *Cr-subpingens* · *cr-rubens* aus *Oe. silesiaca* × *cr-biennis*.

Wenn, wie es gelegentlich geschieht, die cruciate *pictirubata* normalkronige Individuen „abspaltet“, möchte man annehmen, daß in *rubens* *cr_c* zu *Cr* revertiert wird und über *cr* in *pingens* dominiert oder dessen *cr* zu *Cr* konvertiert (vgl. IV, S. 602). Überraschenderweise ist durch Kreuzungen in *cr-pictirubata* wohl *Cr-pingens* nachgewiesen, aber nicht *Cr-rubens* (Tabelle 2). Die plausibleste Erklärung scheint mir, daß in einer zu *Cr-pingens* · *Cr-rubens* mutierten Zelle das *Cr* in *rubens* labiler sein kann als das in *pingens* und dann gegen das durch die Kreuzung hinzutretende *cr* leichter unterliegt.

Ein *cr*-Allel in *pingens*, das in der Kreuzung *atrovirens* × *Cr-biennis* zunächst konversionsaktiv war, unterliegt bei einem zweiten Zusammentreffen mit *Cr* meistens gegen dieses. Das gilt für *cr-pictirubata* nicht nur bei Kreuzungen mit *Cr-biennis* (Bestätigung der Befunde von IV, S. 594), sondern auch bei der mit anderen *Cr*-Sippen; vgl. Tabelle 4. Analog verhält sich (*atrovirens* × *suaveolens*) *pictiflava* (Tabelle 11). Diese „Schwächung“ im Zusammenhang mit Konversion ist weniger ausgeprägt bei dem *Cr*-Allel von *rubens* in *pictirubata*; denn bei Rückkreuzung von *atrovirens* als Mutter mit *Cr-pictirubata* unterliegt das *Cr* von *rubens* nicht so regelmäßig gegen *cr* von *pingens* (Tabelle 7).

Auch in den Kreuzungen von *Cr-pictirubata* mit *atrovirens* ♂ und mit *biennis cruciata* ♂ setzt sich das durch Konversion erworbene *Cr* von *pingens* überraschend oft gegen das starke *cr* von *flectens* bzw. von *cr-rubens* durch (Tabelle 2). Aber in den ersten Versuchen des Jahres 1926 war die Stabilität des aus *cr* zu *Cr* konvertierten Allels in *pingens* noch viel auffälliger: die Kreuzung von *Cr-pictirubata* mit *atrovirens* lieferte fast nur *Cr-pictiflexa*, und die mit *cr-biennis* nur *Cr-pictirubata* (Mitt. I, Nr. 970 und 971); auch *Cr-pictiflava* × *cr-biennis* brachte damals nur *Cr*-Nachkommen, *pictirubata* wie *flavirubata* (Nr. 951), die Kreuzung mit *atrovirens* allerdings nur zur Hälfte *Cr*-, zur andern Hälfte intermediäre bis cruciate *pictiflexa*, neben *Cr-flaviflexa* (Nr. 949). Das waren die

Experimente, von deren Ergebnissen die Annahme der Konversion in erster Linie ausging, und die Enttäuschung war nicht gering, als die ersten schlagenden Befunde sich später nicht reproduzieren ließen: in den Versuchen von 1939 und 1940 brachten Kreuzungen von *Cr-pictirubata* mit *atrovirens* neben 98 *cr*- und 27 intermediären nur 32 *Cr-pictiflexa*, und aus *Cr-pictirubata* $\times$ *cr-biennis* gingen 171 *cr*-, 10 intermediäre und nur 3 *Cr-pictirubata* hervor (III, S. 584). Demgegenüber sind die letzten Versuche der Tabelle 2 sogar wieder „besser“ ausgefallen. Augenscheinlich hat sich das Stärkeverhältnis der *Cr*- bzw. *cr*-Allele in den durch Selbstung fortgepflanzten Sippen im Laufe der Jahre verschoben. Man könnte z.B. daran denken, daß die cruciate *Oe. atrovirens*, als sie in Kultur genommen wurde, vor noch nicht langer Zeit durch Kreuzung einer *Cr*-Sippe, wie es die *Oe. silesiaca* ist, mit einem cruciaten Vater entstanden war. Die Tendenz von *pingens* zum *Cr*-Status hat sich bis heute nicht verloren, während *flectens* zäher am *cr*-Zustand festhält.

Der Bastard (*atrovirens* $\times$ *Lamarckiana*) *pictilaeta* ähnelt im Verhalten der *pictirubata* sehr. Die Verbindungen von *pingens* mit den einander ähnlichen Komplexen *velans*, ^h*Hookeri*, ^h*franciscana*, ^h*purpurata* sind in F₁ teils *Cr* teils *cr*; die *Cr*-Typen sind bei Selbstbestäubung konstant, die *cr*-Typen spalten, ebenso wie *cr-pictilaeta*, mehr *Cr* ab als die *cr-pictirubata* tut. Bei (*atrovirens* $\times$ *Cr-biennis*) *flexirubata* war wie früher umgekehrt der *Cr*-Zustand labiler als die *cr*-Form. Die mangelhafte Konstanz all dieser Typen ist wohl so zu verstehen wie in IV, S. 595, auseinandergesetzt.

Die bei Kreuzung von *pictirubata* mit *cr-sp-blandina* entstandene *pictilevata* bringt bei Selbstung u.a. einen Typus, der im Habitus sich der *blandina* nähert, aber durch spitzen Kelch sich als *picta* zu erkennen gibt. Er muß das 11.12-Chromosom von *blandina* doppelt besitzen, und das ist bemerkenswert, weil über den Gen-Inhalt von 11.12 nichts bekannt ist außer *def* (defekter Kelch) in *flavens* (RENNER 1933, S. 240; 1942, S. 193; von HARTE, 1948, nicht gefunden).

Verarbeitet sind in dieser letzten Mitteilung 225 Familien (712—936).

Rückblick

An der von OEHLKERS und von mir gemachten Annahme, daß die cruciaten Sippen sich von den normalkronigen durch den Besitz eines einzigen rezessiven Allels (*cr*) unterscheiden, wie es für *Epilobium hirsutum cruciatum* sicher gilt, ist kaum zu zweifeln; alle weiteren Ausführungen ruhen auf diesem Grund. Kreuzung cruciater Sippen untereinander gibt immer streng cruciate Nachkommenschaft. Gegen normalkronige Sippen (*Cr*) ist der *cruciata*-Charakter der kleinblütigen *Oe. Lamarckiana subcruciata* immer rezessiv, der von *Oe. biennis cruciata* und von *Oe. atrovirens* zeigt, provisorisch ausgedrückt, wechselnde Dominanz. Das *cr*-Gen der *Oe. Lamarckiana* ist also mit den Allelen der beiden anderen Arten wohl nicht identisch; vermutlich stehen die *cr*-Gene aller drei Arten zueinander im Verhältnis multipler Allelie. Ob auch die *cr*-Allele der beiden in einer Art vereinigten Komplexe verschieden sein können, wie OEHLKERS (z.B. 1930a, S. 535) meint, ist unklar, denn quantitativ verschiedene Wirkung z.B. von *albicans* und *rubens* der *Oe. biennis cruciata* in den reziproken Kreuzungen mit der homozygotischen *Oe. Hookeri* könnte auf einem Einfluß anderer Elemente der beiden Genome beruhen. Ein Zusammenhang der Kronblattgestalt mit dem Plasma bzw. den Plastiden ist nicht beobachtet worden. Die

zwischen den Extremen *Cr* und *cr* sich bewegende Variabilität der Petalenbeschaffenheit in F_1 der meisten $Cr \times cr$ -Verbindungen ist zu einem wesentlichen Teil genotypischer Art, als Mutation bzw. Konversion zu verstehen, bei den Bastarden zwischen *Oe. Hookeri* und *Oe. biennis cruciata* ist sie vielleicht modifikativer Natur (VII). Am eindringlichsten gibt sich der mutative Charakter der Variabilität darin zu erkennen, daß *Cr*- und *cr*-Sektoren einer und derselben Pflanze ihre Kronengestalt jeweils streng reproduzieren können.

In den Bastarden von *Oe. blanda* und *Oe. Hookeri* mit *Oe. biennis cruciata* als Vater (VI, VII) ist *cr* mit *sp* (stumpfer Kelch) gekoppelt, das in 5.6 von *rubens* liegt, und damit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ort der *Cr*-Gene das 5- oder das 6-Ende ermittelt. Die Genome ^h*Hookeri*, ^h*blanda* (= *levans*) und *flavens* (von *Oe. suaveolens*) können deshalb wie es scheint *cr* aus *cr-rubens* auf dem Weg einfacher Rekombination sich eingliedern. In allen anderen $Cr \times cr$ -Verbindungen, in denen 5.6 einfach vorhanden ist oder ganz fehlt, kann der *Cr* führende Komplex durch somatische Konversion (vielleicht auch durch Crossing-over) in den *cr*-Zustand übergehen und vice versa, und wo zwei 5.6-Chromosomen einander gegenüberstehen, kann die Rekombination von *Cr-cr* durch Konversion gestört werden.

Das beste Beispiel von Konversion, d.h. von durch Heterozygotie verursachter Mutation, ist noch immer das zuerst gefundene, das der *Oe. (cr-atrovirens* $\times$ *Cr-biennis*) *pictirubata*. Die so gut wie absolute Konstanz der normal-kronigen Form bei Selbstung (I, S. 117; III, S. 582; VIII, Tabelle 1a und b) sagt bei der Struktur der komplexheterozygotischen Oenotheren noch nicht viel, es könnte ja *Cr* in *rubens* über *cr* in *pingens* dominieren und jedes der beiden Allele an den ursprünglich tragenden Komplex fest gebunden bleiben. Aber Kreuzungen mit Sippen, die ein schwaches *cr* besitzen, zeigen, daß *Cr-pictirubata* in *Cr* fast homozygotisch geworden ist (III, S. 584, $\times$ *Lamarckiana subcruciata*; VIII, Tabelle 2, ebenso und $\times$ *cr-sp-blanda* und *cr-sp-Hookeri*): die *pingens*-Eizellen besitzen alle oder größtenteils *Cr*, die wenigen *rubens*-Eizellen ebenso, und für den *rubens*-Pollen gilt dasselbe (III, Nr. 107; VIII, Tabelle 6). Das Auftreten cruciater Individuen in diesen Familien kann teilweise darauf zurückgeführt werden, daß ein geschwächtes *Cr* gegen ein nicht gar zu schwaches *cr* unterlag, und die in geringer Zahl fast überall vorkommenden intermediär blühenden Pflanzen fordern eine solche Deutung sogar. Solche Überlegung macht es wahrscheinlich, daß die durch Konversion des *cr* herbeigeführte Homozygotie in *Cr* noch vollkommener ist als die Kreuzungsergebnisse auf den ersten Blick erkennen lassen. — Der cruciate Status der *pictirubata* ist nicht ganz so konstant wie der normalkronige, aber durch Kreuzung mit schwachen *cr*-Sippen läßt sich wieder nachweisen, daß, während *pingens* das angestammte Allel behält, der *rubens*-Komplex anstelle von *Cr* das Allel *cr* erworben hat. Die *cruciata*-Prägung beruht also nicht auf Dominanz oder Prävalenz von *cr* über *Cr*, sondern auf Präpotenz, d.h. konversionsaktivem Verhalten des im normalen Erbgang rezessiven Allels. — Auch das Verhalten der tetraploiden *pictirubata gigas*, die nicht selten in F_1 und später auftritt, bestätigt die Konversion zum homozygotischen Status. Die Kreuzung *biennis cruciata* $\times$ *pictirubata* 4n *Cr* brachte lauter normalkronige *albicans* $\cdot$ [*pingens* + *rubens*] (Mitt. II, Nr. 1151; IV, Nr. 1640—1642); und *Cr-biennis* $\times$ *pictirubata* 4n *cr* brachte zur Hauptsache

cruciate *albipictirubata* (IV, Nr. 1664, 1665), wie bei OEHLKERS (1935, S. 197) aus der Kreuzung *suaveolens* $\times$ *biennis cruciata gigas*, wo also einem *Cr* sicher 2 *cr* gegenüberstanden, nur cruciate *albicans* . [*albicans* + *rubens*] hervorging.

Bedeutsam sind auch die immer normalkronigen Zwillinge aus *Oe. Cr-biennis* $\times$ *Lamarckiana subcruciata*, *Cr-albicans* · *cr-gaudens* und *Cr-albicans* · *cr-velans*. Die aus Kreuzung von *Cr-albilaeta* mit *Cr-albivelutina* rekonstruierte *Lamarckiana* ist entweder durchaus normalkronig (V, S. 348, Nr. 30, 31) oder zum größten Teil so (Nr. 32, 33). Die Konversion von *cr* zu *Cr* kann also vollständig sein, in *gaudens* wie in *velans*, muß es aber nicht sein. Immer wieder ergibt sich, daß die Konversion eine Möglichkeit darstellt, nicht einen Zwang wie die Mendelsche Rekombination.

Weniger durchsichtig ist das Verhalten der Bastarde aus *Oe. biennis cruciata* $\times$ *Lamarckiana* Standard. *Albilaeta* wie *albivelutina* treten in F_1 teils als *Cr* teils als *cr* auf, und sämtliche Typen sind bei Selbstung in bezug auf die Petalengestalt meist nicht konstant, aber aus den *cr*-Formen werden viel weniger *Cr* abgespalten als *cr* aus den *Cr* (V, S. 355). Um rein modifikative Schwankung der Dominanz kann es sich also nicht handeln, wenn auch Modifikation und Mutation sich vielleicht überlagern. Ohne viel Zwang läßt sich die „Abspaltung“ cruciater Individuen aus *Cr*-Pflanzen mit nachträglicher Konversion von *Cr* zu *cr* erklären, wenn die Mutterpflanze noch *cr-albicans* besaß, das Hervorgehen von *Cr* aus *cr* mit Rückmutation (Reversion) von *cr_c* zu *Cr* (V, S. 386). Eine gewisse Labilität bei den konvertierten Genen ist ja nicht zu verwundern.

Infolge des bekannten Austausches der Blütengrößefaktoren (*Co-co*) sind konstant großblütige (*co co*) und konstant kleinblütige (*Co Co*) Typen der Zwillinge zu gewinnen. Großblütig cruciate *albilaeta* ist in bezug auf die Petalengestalt labil und gleitet nach *Cr* hin ab, kleinblütige *albilaeta* und *albivelutina* sind recht stabil, doch nicht in dem Maß wie *biennis cruciata* (V, S. 360ff.). In der aus großblütiger *cr-albilaeta* hervorgegangenen *Cr*-Form ist *co-albicans* zu *Cr* konvertiert. Die stabil cruciaten kleinblütigen Typen von *albilaeta* und *albivelutina* enthalten das ursprüngliche *cr-albicans* und dazu ein konvertiertes *cr_c* in *gaudens* bzw. *velans*. Zwei konvertierte *Lamarckiana*-Komplexe lassen sich zusammenfügen durch Kreuzung von *cr-albilaeta* mit *cr-albivelutina*. Und nun ergibt sich, daß die so gewonnene *cr-Lamarckiana* sehr gut cruciat und dabei recht stabil ist wenn kleinblütig *Co Co*, daß sie breit cruciat sein kann, wenn mittelgroßblütig *Co co*, und daß sie meist auf Normalkronigkeit zurückfällt als großblütige *co co* (V, S. 373ff.). Der Einfluß der *Co*-Faktoren auf die Wirkung des *cr*-Allels ist hier ebenso deutlich wie bei *albilaeta*; *Co* begünstigt die Ausprägung und Stabilisierung von *cr*, *co* wirkt ihr entgegen. — Ein ähnlicher Einfluß wie von *Co* geht bisweilen, wie es scheint, von dem Rotnervfaktor *R* im 1.2-Chromosom von *rubens* (VII) und *gaudens* aus (V, S. 364).

Die durch Konversion entstandenen Zustände von *Cr* und *cr* sind in den neuen Komplexen, in die sie sich eingedrängt haben, schwächer — d.h. in ihrer Valenz wie in ihrer Potenz gemindert — und labiler als ursprüngliches *Cr* bzw. *cr*. Das gilt z.B. für *cr Co-gaudens* und *cr Co-velans* in den *albicans*-Verbindungen (V, S. 364, 369), für beide Komplexe der *cr-Lamarckiana* (V, S. 379), für *Cr-pingens* und *Cr-flectens* (III, S. 574; VIII, Tabelle 3; III, Nr. 897); *cr-rubens* aus *pictirubata* ist etwas unklar (III, S. 575). Eine gewisse Stabilisie-

rung kann in späteren Generationen eintreten (IV, S. 597). Sogar die *cr*-Allele, die, wie ich annehme, mit dem ganzen 5*sp*6-Chromosom in die homozygotisch zu verwirklichenden Genome ^{*h*}*Hookeri* und ^{*h*}*blandina* (*levans*) aufgenommen wurden, sind, wohl durch das neue Genmilieu, in ihrer Stabilität und ihrer Stärke beeinträchtigt (VII); nicht umsonst wurden *cr sp-blandina* und *cr sp-Hookeri* oft verwendet, wo für eine Analyse ein schwaches *cr* erwünscht war.

Auch solche Allele, die bei der Konversion in der Bindung an den angestammten Komplex die Oberhand behielten, präpotent waren, sind wenigstens zunächst geschwächt, wie die Kreuzungsfolgen (*cr* × *Cr*)*cr* × *Cr* und *cr* × (*cr* × *Cr*) *Cr* zeigen (z. B. IV, S. 594; VIII, Tabelle 4, Tabelle 11).

Ein eigentümliches Phänomen ist bei einigen Bastarden beobachtet worden, die ein ursprüngliches *Cr* und ein durch Konversion entstandenes schwaches *cr* in sich tragen (*albivelutina* und *Lamarckiana*). Bei Selbstung sind sie konstant, bei Verbindung mit schwachen *cr*-Sippen erscheinen jeweils beide Komplexe labil (V, S. 385).

Die zweiseitige Konversion ist vielleicht zu erklären mit der Annahme, daß die Antagonisten *Cr* und *cr* sich zunächst zu einem intermediären und labilen Status abgleichen, der mitunter, in den intermediären Gestalten, längere Zeit erhalten bleibt, doch gewöhnlich entweder nach der *Cr*- oder nach der *cr*-Seite, als *Cr Cr* oder als *cr cr*, sich stabilisiert. Nach erfolgter Konversion ist weder das präpotente noch das unterliegende — wenn es lateinisch sein muß succumbente — Allel mit dem ursprünglichen identisch. Welche Umstände dem dominanten oder dem eigentlich rezessiven Allel zur Präpotenz verhelfen, ist ganz unklar. Um reine Zufallsentscheidungen kann es sich nicht handeln, weil *Cr*- und *cr*-Individuen selten gleich häufig sind.

Das Charakteristikum eines schwachen *cr*-Allels ist weniger, daß es sich gegen *Cr* rezessiv verhält — es ist immer rezessiv —, sondern daß es leicht konversibel ist und nicht oder kaum konversionsaktiv auftritt. Denn was als Dominanz von *cr* (eines starken *cr*) über *Cr* erscheint, beruht meistens auf Konversion des *Cr* zu *cr*. Die ursprünglichen *Cr*-Allele sind immer stark. Dominanz über ein unverändert bleibendes *cr* kommt vor; *Oe. (biennis* × *suaveolens* Friedrichshagen) *albiflava* erwies sich als eine stabile *cr Cr*-Heterozygote (V, S. 352), nicht anders als *Epilobium cr Cr-hirsutum* (z. B. ESCHENBECHER).

Das *Cr*-Allel von *Hookeri* ist konversionsaktiv, aber kaum konversibel (VII). Aus den seltenen cruciaten Individuen von *Oe. (biennis cruciata* × *Hookeri*) *albi-hookeri* spaltet bei Selbstung nur normalkronige *Hookeri* heraus, es macht also den Eindruck, als ob *cr* ausnahmsweise über *Cr* dominieren könnte. Daß die kleinblütigen *Co Co-albihookeri* der späteren Generationen meistens cruciat sind, erscheint bei der fördernden Wirkung von *Co* auf die Manifestierung von *cr* weniger auffällig. Ganz unbeeinflusst durch *cr-albicans* ist *Cr.^hHookeri* aber doch nicht immer, denn wenn auch die aus *cr Co-albihookeri* hervorgehende kleinblütige *Hookeri* stets ganz normale Petala hat, so erscheint ihr *Cr* doch meistens etwas geschwächt. Das Verhalten der *Oe. (Hookeri* × *biennis cruciata*) *hookeri-rubata*, die in F₁ öfter ± cruciat auftritt, ist schwer zu beurteilen wegen der Rekombination von *Cr-cr*. Daß in *Oe. (atrovirens* × *Hookeri*) *pictihookeri* Konversion von *Cr* zu *cr* in ^{*h*}*Hookeri* vorkommt, ist wahrscheinlich (III, S. 117).

Man kann sich vorstellen, daß, wenn *cr* über ein anscheinend unverändertes *Cr* dominiert, doch ein ganz schwacher Grad von Konversion vorliegt, daß das *Cr* durch eine von *cr* ausgehende Wirkung nur bis zur Rezessivität gegen *cr* abgeändert wird, und daß diese Veränderung leicht rückgängig gemacht werden kann, daß sie z. B. in den *Co Co-Hookeri*, also nach Aufhebung des Kontakts mit *cr-albicans*, meist ausgelöscht wird. Vor allem in den späteren Generationen dieser kleinblütigen *Hookeri* war ihr *Cr* recht stark.

Alle Zwischenstufen zwischen voll petalischer und streng sepaloïder Gestalt und Struktur kommen nicht nur in den primären Bastarden vor, sondern auch dann, wenn labile *cruciata*-Formen, wie großblütige *cr-albilaeta* und *cr-sp-blandina*, zu *Cr* hin mutieren (KOWALEWICZ). Die letzten Spuren des *cruciata*-Charakters bestehen in leichten Zähnelungen und Verkrüppelungen des Randes sonst normaler Kronblätter und in dem Vorkommen kleiner Inseln behaarter, mitunter auch Stomata tragender Epidermis auf der Außenseite der Petala. Man könnte vermuten, daß die *Cr*-Allele aus einer größeren, wechselnden Zahl von Unter-einheiten bestehen. Solche quantitativen Unterschiede und ihre Schwankungen spielen in der Deutung, die OEHLKERS (1930 a und b, 1935, 1938) den Phänomenen gegeben hat, eine wesentliche Rolle. Die Vorstellung, daß *Cr*- und *cr*-Einheiten qualitativ verschieden seien, würde gewissen Erscheinungen, die gelegentlich als „Reste von *cruciata*-Eigenschaften“ bezeichnet wurden, vielleicht eher gerecht als die Oehlkerssche Annahme, ein starkes *cr* besitze die kleinste Menge von Elementen, die in einem starken *Cr* in gleicher Qualität aber größter Menge zugegen wären.

Ob die *Cr*-Gene auf dem Weg des Crossing-over ausgetauscht werden können, ist unentschieden. Gewisse seltene Genkombinationen würde man anderswo ohne weiteres auf Crossing-over zurückführen, aber wo Konversion ihr Wesen treibt, ist Rekombination schwer von ihr zu trennen. Wenn Crossing-over nicht vorkäme, der *Cr*-Locus also weit nach innen läge, könnte man überlegen, ob die Labilität der *Cr*-Gene etwas mit dem Heterochromatin zu tun hat; zu einer Ausmalung etwa vorhandener Zusammenhänge im Anschluß an die Ergebnisse anderer Autoren reicht das empirische Material nicht aus. Für cytologische Analyse wäre eine Komplexverbindung, die als einziges gepaartes Chromosom 5.6 besitzt, wie *rubiflava*, am günstigsten.

Fälle von mutmaßlicher somatischer Konversion bei anderen Objekten habe ich in IV, S. 603ff., und in V, S. 389 erörtert. Neu hinzugekommen ist eine Mitteilung von ERNST (1957, S. 584f.), der meint, bei gewissen Ausnahmefällen im Erbgang der Heterostylie von *Primula* sei die Annahme „nicht ganz abwegig . . ., daß . . ., wenn auch mit zahlreichen Klauseln, eine Art Konversion wirklich vorliegen könnte“. In der Meiose, in welcher Konversion bei Blütenpflanzen (REIMANN-PHILIPP 1955) und bei Pilzen wie *Saccharomyces* (LINDEGREN; WINGE widerspricht, EMERSON zweifelt), *Neurospora* (MITCHELL, BEADLE, FREESE), *Aspergillus* (STRICKLAND), auch bei *Drosophila* (?; GOLDSCHMIDT, der als einziger unter den angelsächsischen Autoren auf *Oenothera* hinweist) beschrieben wird, spielt sie bei *Oenothera* wohl keine beträchtliche Rolle. Das Wesen der somatischen Konversion ist noch ganz dunkel; irgendeine stoffliche Wechselwirkung (ähnlich der Transduktion?) zwischen den beiden Allelen, die auf getrennten Chromosomen liegen, könnte wohl am ehesten im Ruhekern oder in

der Prophase stattfinden. Ob die Vorgänge bei *Oenothera* mit der „Konversion“ bei *Neurospora* überhaupt vergleichbar sind, ist fraglich.

Meiner früheren Auseinandersetzung (IV, S. 600ff.) über das Verhältnis zwischen der im Phänischen sich abspielenden Prävalenz (Dominanz) und der in der genischen Sphäre wirksamen Präpotenz habe ich nichts hinzuzufügen.

Die Wirkungsweise des *cr-* gegenüber der des *Cr*-Gens ist außerordentlich polyphän: Gestalt, Farbe, anatomische Struktur, Entwicklungsweise der Petala, alles ist tief verändert (KOWALEWICZ), sie werden mit einem Wort zu Sepala. Die Umstellung der Phyllomgestaltung vom Kelch zur Krone unterbleibt bei den cruciaten Formen. Man könnte daran denken, daß das normale Umspringen vom Kreis der Kelchblätter zu dem der Kronblätter durch einen vom *Cr*-Allel produzierten Wirkstoff herbeigeführt wird, der bei den Cruciaten fehlt. Ein nicht mutables, in Kreuzungen normal mendelndes *cruciata*-Gen liegt bei *Epilobium* vor, bei *Oenothera* wird das *cr-* wie das *Cr*-Gen durch Kreuzung meistens in einen labilen Zustand versetzt. Eine analoge Erscheinung ist von *Colchicum autumnale* bekannt, bei dem die Perigonzipfel durch lange schmale Laubblätter ersetzt sein können (Bild bei HEGI, 2. Aufl., S. 250); ob die Abweichung auch hier erblich ist, bleibt zu untersuchen. Das Gegenstück zur Sepaloidie der Kronblätter stellt die Calycanthemie von *Campanula*, *Primula*, *Soldanella* usw. dar, deren Wesen darin besteht, daß der Zustand der Petala in den Kelch verlegt wird. Die Polyphänie des *Cal*-Gens erstreckt sich bei *Campanula medium* f. *calycanthema* — nicht bei den anomalen Sippen von *Primula* und *Mimulus* — bis auf die Beschaffenheit des Gynäceums. Die Samenanlagen sind, obwohl sie einen normal aussehenden Embryosack besitzen, selten fertil, die Kapsel hat eine zartere, nicht aufspringende Wand, und wenn der Fruchtknoten sogar in der Färbung den Kronblättern gleicht, ist „die Samenproduktion stets gleich Null“. Wie CORRENS betont, muß diese Besonderheit mit der Unterständigkeit des Fruchtknotens zusammenhängen. Wir können jetzt sagen; die kronblattartige Beschaffenheit des Kelchgewebes, das ja mit den Carpellen „kongenital verwachsen“ ist (vgl. dazu z.B. KOWALEWICZ), erlaubt keine normale Ausbildung des Fruchtknotens. Wie die Sepaloidie der Petala bei *Epilobium* und normalerweise auch bei *Oenothera* rezessiv ist, dominiert die Petaloidie der Sepala bei *Campanula* und *Mimulus* (CORRENS 1905), ebenso bei *Primula* (ERNST 1936); die von ERNST eingehend studierte Labilität des Calycanthemie-Allels ist vielleicht durch Konversion bedingt. Ein weiteres Analogon ist die so häufige Blütenfüllung, bei der der Kronblattzustand bis in die Sphäre der Staubblätter hinein fort dauert; daß die Petaloidie der Stamina rezessiv ist, versteht sich nach den übrigen Erfahrungen. Die Elementarvorgänge, die der Metamorphose der Blätter zugrunde liegen, werden wohl einmal an der biochemischen Wurzel erfaßt werden.

Die Einsicht in den Erbgang des *cruciata*-Merkmals, die im Laufe von 30 Jahren aus einer Wirrnis von Erscheinungen, unter Beiziehung der Erfahrungen von OELHKERS, abgeleitet wurde, ist noch immer unbefriedigend. Die vorgetragenen Überlegungen mögen fehlgehen, die versuchten Deutungen mögen hinfällig sein. „Was bleibt aber, stiften“ die Experimente. Was Dauer hat, sind die immer wieder hervorzurufenden *Phänomene*; einmal werden sie wahr gedeutet werden.

Literatur

- BAERECHE, MARIA-LUISE: Zur Genetik und Cytologie von *Oenothera ammophila*, Bauri, Beckeri, parviflora, rubricaulis, silesiaca. Flora (Jena) **138**, 57—92 (1944). — CORRENS, C.: Einige Bastardierungsversuche mit anomalen Sippen und ihre allgemeinen Ergebnisse. Jb. wiss. Bot. **41**, 458—484 (1905). — ERNST, A.: Erblichkeitsforschungen an calycanthemen Primeln. Züchter **8**, 281—294, 313—324 (1936). — Vererbung durch labile Gene. I. Teil. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. Erg.-Bd. zu Bd. **17**, 1—567 (1942). — Austausch und Mutation im Komplexgen für Blütenplastik und Inkompatibilität bei *Primula*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 517—599 (1957). — ESCHENBECHER, F.: Über den Erbgang der Sepaloidie bei *Epilobium*. Z. Bot. **44**, 89—108 (1956). — GOLDSCHMIDT, R. B.: On some phenomena in *Drosophila* related to so-called genic conversion. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 1019—1026 (1957). — FREESE, E.: Über die Feinstruktur des Genoms im Bereich eines pab Locus von *Neurospora crassa*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 388—406 (1957). — HARTE, C.: Zytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden *Oenothera*-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 495—640 (1948). — HEGI, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, 2. Aufl., Bd. II, Monocotyledones (Teil II). München o.J. — KOWALEWICZ, ROSE: Entwicklungsgeschichtliche Studien an normalen und cruciaten Blüten von *Epilobium* und *Oenothera*. Planta (Berl.) **46**, 569—603 (1956). — OEHLKERS, F.: Studien zum Problem der Polymerie und des multiplen Allelomorphismus. I. Z. Bot. **22**, 473—537 (1930a). — II. Z. Bot. **23**, 967—1003 (1930b). — III. Die Erblichkeit der Sepaloidie bei *Oenothera* und *Epilobium*. Z. Bot. **28**, 161—222 (1935). — Über die Erblichkeit des cruciata-Merkmals bei den *Oenotheren*; eine Erwidern. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 277—297 (1938). — RENNER, O.: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **130**, 218—290 (1936). — Zur Kenntnis der Plastiden- und Plasmavererbung. Cytologia (Tokyo), Fujii-Jubiläumsband **1937**, 644—653 (1937a). — Über das crossing-over bei *Oenothera*. Flora (Jena) **136**, 117—214 (1942). — Über *Oenothera atrovirens* und über somatische Konversion im Erbgang des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 91—124 (1937b). — II. Über gigas- und hemigigas-Formen und ihre Verwendung zur Untersuchung des cruciata-Merkmals. Flora (Jena) **133**, 215—238 (1939). — RENNER, O., u. R. SENSENHAUER: III. Versuche über den Erbgang des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. Weitere Belege für somatische Konversion. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 570—589 (1942). — RENNER, O.: IV. Beiträge zur Kenntnis des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. Gigas-Bastarde, Labilität und Konversibilität der Cr-Gene. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 590—611 (1942). — V. Über den Erbgang des cruciata-Merkmals der *Oenotheren*. Planta (Berl.) **48**, 343—392 (1957). — VI. Verbindungen der *Oenothera Lamarckiana* mut. *blandina*. Z. Vererbungslehre **89**, 14—35 (1958). — VII. Verbindungen der *Oenothera Hookeri*, *franciscana* und *purpurata*. Flora (Jena) **145**, 339—373 (1958). — SCHÖTZ, F.: Über Plastidenkonkurrenz bei *Oenothera*. Planta (Berl.) **43**, 182—240 (1953). — STRICKLAND, W. N.: Abnormal tetrads in *Aspergillus nidulans*. Proc. roy. Soc. **148**, 533—542 (1958). — WINKLER, H.: Die Konversion der Gene. Jena **1930**. — Konversions-Theorie und Austausch-Theorie. Biol. Zbl. **52**, 165—189 (1932). — Konversions-Theorie und Austausch-Theorie. II. Biol. Zbl. **53**, 75—98 (1933).

Prof. Dr. O. RENNER, Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Str. 67

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen

EINE GENETISCH BEDINGTE STÖRUNG DER ZELLTRENNUNG
BEI *PARAMAECIUM AURELIA* VAR. 4*
EIN BEITRAG ZUM PROBLEM DER MUTABILITÄT
PLASMATISCHER SYSTEME

Von

ROLAND MALY

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1958)

Jede beobachtete Abweichung im Verhalten eines Organismus eröffnet uns neue Einblicke in die Vielfalt von Funktionen und Strukturen, deren geordnetes Zusammenwirken erst das ergibt, was wir Wachstum und Entwicklung nennen. Bei der Vermehrung von *Paramaecium* durch Zweiteilung sind Plasmawachstum, Kernteilung und die Trennung der Tochterindividuen aufeinander abgestimmt, und in der Regel entstehen zwei Tiere mit identischer Ausstattung an Kernen und Plasma, die sich voneinander trennen. Plasmawachstum, Kernteilung und Trennung der Zellen können aber durch Mutationen gestört sein. Das zeigt z. B. die Mutante *am* (*amacronucleate*) von *Paramaecium aurelia* var. 4, bei der die Verteilung der Makronuklei auf die Tochterzellen so ungleich ist, daß bis zu 30% Tochtertiere ohne Makronukleus entstehen (SONNEBORN unveröff.). Bei dem Phän, von dem die hier veröffentlichten Untersuchungen ausgingen, ist Plasma- und Kernwachstum und Teilung zwar normal aufeinander abgestimmt, aber die Trennung der Tochtertiere ist gestört, und so kommt es zu Ketten oder Klumpen von mehreren Tieren. Das ist an sich nichts Neues, denn Fälle von Klumpen- oder Kettenbildungen werden als Monstra bezeichnet und sind mehrfach beschrieben worden. WICHTERMANN (1953) hat diese Fälle zusammengestellt.

Eine Überraschung brachte aber die genetische Analyse. Sie zeigte nämlich, daß das Merkmal „Störung der Zelltrennung“ Ausdruck einer plasmatischen Abänderung ist, die durch ein rezessives Gen induziert wird.

Material und Methoden

Das genetische System von *Paramaecium aurelia* ist in einem Sammelreferat von SONNEBORN (1947) ausführlich dargestellt. Zum Verständnis der vorliegenden Arbeit genügt es zu wissen, daß eine Paarungsreaktion, die schließlich zu Kernaustausch und wechselseitiger Karyogamie führt, nur zwischen komplementären Paarungstypen, in diesem Fall VII und VIII, möglich ist. „Killer“ sind Tiere, die in die Kulturflüssigkeit ein Gift abscheiden, von dem „Sensitive“ getötet werden. Killer haben im Zytoplasma viele (4—800) selbstvermehrungsfähige Partikel unbekannter Herkunft, die „Kappa“ genannt werden. Sensitive dagegen enthalten kein Kappa. Kappa kann nur in solchen Tieren erhalten und vermehrt werden, die das dominante Gen *K* besitzen. Sensitive enthalten kein Kappa, gleichgültig ob sie im Kern *K* oder *k* haben.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Autogamie ist ein Befruchtungsprozeß ohne Paarung, sie kann durch Hunger induziert werden. *P. aurelia* hat einen Makronukleus und zwei Mikronuklei. Wie bei der Paarungsreaktion zerfällt bei der Autogamie der Makronukleus, beide Mikronuklei durchlaufen die Meiose. Von den 8 haploiden Kernen gehen 7 zugrunde, der übriggebliebene haploide Kern teilt sich und die Produkte dieser Teilung verschmelzen zu einem neuen, diploiden Kern. Zwei weitere Teilungsschritte ergeben 4 diploide Kerne, von denen sich 2 zu neuen Makronuklei entwickeln. Das Resultat der Autogamie für das Individuum ist absolute Homozygotie. Die Nachkommenschaft eines monohybriden Bastards nach Autogamie enthält die Elterntypen demnach im 1:1-Verhältnis.

Gearbeitet wurde mit den Stämmen 51 (KK) und d-4-6 (kk) aus var. 4, und es werden im Text die folgenden Phänbezeichnungen verwendet:

S und K bezeichnen den Phänotyp Sensitiv und Killer,

VII und VIII die komplementären Paarungstypen.

„Mo“ bedeutet, daß der betreffende Stamm oder die Kultur Monstra bildet, „normal“ hingegen, daß keine Monstra beobachtet wurden.

Genbezeichnungen sind kursiv gedruckt.

Kulturmethoden und Kreuzungstechnik sind bei SONNEBORN (1950) beschrieben. Standardtemperatur für die laufenden Kulturen war 27° C, und es wurde ausschließlich Salatmedium („baked lettuce medium“ s. SONNEBORN l.c.), beimpft mit *Bacterium aerogenes*, verwendet. Reserve- und Dauerkulturen wurden in Strohmedium bei Zimmertemperatur gehalten und nur alle 4—6 Wochen gefüttert. Wenn nicht anders vermerkt, sind unter Kulturen stets solche in Hohlsliffobjektträgern („depression slide“ l.c. page 88, fig. 1a) gemeint, diese werden der Kürze halber „slides“ genannt. Jede Vertiefung faßt 1 cm³. Bei 27° C und in Salatmedium durchläuft ein Tier in 3 Tagen 9—10 Teilungen und hat in dieser Zeit das Medium aufgebraucht (von Bakterien geklärt).

Das Merkmal

Die ersten Monstra wurden in einer exautogamen Isolierung von Stamm 51, VIII S gefunden. In der betreffenden Kultur waren unter etwa 700 Tieren einige größere Klumpen, die aus je 6—10 Einheiten bestanden. Klumpen und normale Tiere dieser Kultur wurden isoliert¹. Die Klumpen wurden größer und spalteten vereinzelt freie, normale Tiere ab. Die normalen Tiere gaben wieder normale und Monstra; in der Folge wurden nur mehr normale Tiere isoliert. Es zeigte sich, daß die Häufigkeit und Stärke der Bildung von Monstra abhängig war von dem Gehalt an Monstra in der Kultur, aus der isoliert wurde. Um stets gut wachsende Kulturen mit Monstra zur Verfügung zu haben, wurde bei der Führung des Mo-Stammes auf mittelstarke Bildung von Monstra selektioniert. Beim Mo-Stamm wurde wie bei den normalen Stämmen wöchentlich, nach je 22—25 Teilungen, Autogamie induziert, um Alterungserscheinungen in den Kulturen zu vermeiden.

Bei den Monstra ist der Durchschnürungsmechanismus in verschiedenem Maße gehemmt. Die Trennung der Tochtertiere kann entweder nur verzögert sein oder ganz unterbleiben: es entstehen Ketten oder Klumpen. Eine Selektion auf reine Ketten- oder reine Klumpenbildung ist nicht möglich. Während in der Kettenbildung die ursprüngliche Teilungsachse beibehalten wird und jedes Einzelglied deutlich erkennbar ist, liegt der Klumpenbildung eine weitergehende Störung des Trennungsmechanismus zugrunde: die Einschnürung unterbleibt entweder ganz oder erfolgt nur einseitig, die Teilungsachsen verschieben

¹ Unter Isolierung ist stets die Übertragung eines einzelnen Tieres in neue Kulturflüssigkeit gemeint.

sich in verschiedenen Winkeln zueinander. Es entstehen dicke Klumpen, knollenförmige Gebilde oder größere Platten von bizarren Formen. Kettenbildung kann in Klumpenbildung übergehen und umgekehrt (s. Abb. 1—3). Längere Ketten zerfallen oft in kürzere Teile, bei Klumpen hingegen wird das Ober-



Abb. 1



Abb. 2

flächen-Volumenverhältnis bei weiterem Wachstum so ungünstig, daß sie bei den angewandten Kulturmethoden bald zugrunde gingen. Wächst das Monstrum in Form einer Platte, so ist das Oberflächen-Volumenverhältnis wesentlich günstiger. An plattenförmigen Monstra konnten mehr als 50 Einheiten ausgezählt werden!

Von Ketten abgeschnürte Einzeltiere sind meist voll lebens- und vermehrungsfähig. Bei Klumpen dagegen ist die Kern-Plasma-Koordination mehr gestört, und häufig werden auch Teile ohne Makronukleus abgeschnürt. Fehlen uns auch genaue Kenntnisse des Durchschnürrungsvorganges bei der Zelltrennung, so kann wohl angenommen werden, daß es ektoplasmatistische Strukturen sind, deren Funktion bei der Mo-Bildung offenbar gestört ist.



Abb. 3

Abb. 1—3. Monstra und ein normales Tier aus einer Kultur

Das Bewertungssystem

Die Stärke der Mo-Bildung wird erfaßt, indem Einzeltiere isoliert werden und nach drei Tagen an den daraus erwachsenen Kulturen bestimmt wird:

1. Die Fraktion der Kulturen, in denen Monstra vorkommen.
2. Die Zahl von Monstra in jeder Kultur.

Zur Kennzeichnung der Kulturen für ihren Gehalt an Monstra bewährte sich ein Zähl- und Schätzungsverfahren, das in Tabelle 1 dargestellt ist.

Das wahre Maß für die Stärke der Mo-Bildung einer Kultur ist die Anzahl von unvollendeten Teilungen innerhalb der Kultur. Isoliert man ein Tier und findet zu einem bestimmten Zeitpunkt dann N Tiere in der Kultur, so wird die Zahl der Teilungen n (Teilungsfolgen) berechnet nach der Beziehung $N = 2^n$.

Tabelle 1

Wertung	Art der Monstra	Zahl der Monstra in der Kultur	Minimum unvollendeter Teilungen
1 ¹	klein (3—5 Einheiten)	3 ² —10	6
2 ¹	klein (3—5 Einheiten)	11—50	22
3 ¹	klein (3—5 Einheiten)	> 50	102
I	groß (>5 Einheiten)	1—5	5
II	groß (>5 Einheiten)	6—10	30
III	groß (>5 Einheiten)	> 10	55

¹ Bei den Normal- und den Mo-Stämmen kommen fast immer Tiere vor, die nur aus 2 Einheiten bestehen und meist hakenförmig aussehen. Diese werden in den Protokollen, wenn keine Mo-Wertung nötig ist, als 1a, 2a, 3a vermerkt, je nachdem 1—10, 11—50 oder über 50 solcher Tiere aus 2 Einheiten vorhanden sind. Ist bei den Mo-Stämmen oft ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Tiere und Monstra gegeben, so stellen sie im Normalstamm nur eine vorübergehende Modifikation dar, wie in umfangreichen Reisolierungen geprüft wurde.

² Kleine Monstra kommen ganz vereinzelt auch in Normalstämmen vor, deshalb wurden 3 kleine Monstra als Minimum für die Wertung 1 genommen.

Zum Zeitpunkt der Bonitur waren in jeder Kultur rund 500—1000 Individuen vorhanden, das isolierte Tier hatte 9—10 Teilungen durchlaufen. Die Zahl der einzelnen abgelaufenen Teilungsschritte jedoch ist ($N-1$); besteht ein Monstrum z. B. aus 7 Einheiten, so sind 6 Teilungsschritte ohne Abtrennung erfolgt. Man kann daher für jede Wertung das Minimum unvollendeter Teilungen angeben, das ist in der letzten Spalte der Tabelle 1 geschehen. Eine Bewertung wie I₃ sagt aus, daß in der Kultur zwischen 1 und 5 große und mehr als 50 kleine Monstra vorhanden sind. Das Minimum unvollendeter Teilungen in einer solchen Kultur ist $5 + 102 = 107$. Auf eine Bestimmung der Häufigkeit unvollendeter Teilungen bezogen auf die Gesamtzahl von Teilungen in jeder Mo-Kultur mußte wegen der großen Zahl auszuwertender Kulturen verzichtet werden.

Das vegetative Verhalten des Mo-Stammes

a) *Im Expansionsversuch*¹. Am besten läßt sich das Verhalten des Mo-Stammes bei vegetativer Vermehrung im Expansionsversuch demonstrieren, s. Abb. 4 und 5. Zur Verwendung kam Stamm A aus Kreuzung 1 = Mo VIII K. Aus einer Mo-Kultur (die Starttiere A, B ... bis E sowie das Starttier von Abb. 4 sind alle aus einem Tier hervorgegangen) wurden Tiere einzeln isoliert und durch 5 Teilungsfolgen die Tochttertiere sofort wieder voneinander isoliert. 3 Tage nach der 5. Teilung wurden die aus jedem Starttier hervorgegangenen 32 Kulturen ausgewertet. Wenige Beispiele aus insgesamt 30 Ver-

¹ Die Expansionsversuche wurden erst im Anschluß an Kreuzung 1 durchgeführt. Sie sind hier vor den Kreuzungen besprochen.

suchen dieser Art mögen genügen. Ein Fall, in dem Monstra schon während der ersten 5 Teilungen auftreten, ist in Abb. 4 vorgeführt. Die Abb. 4 und 5

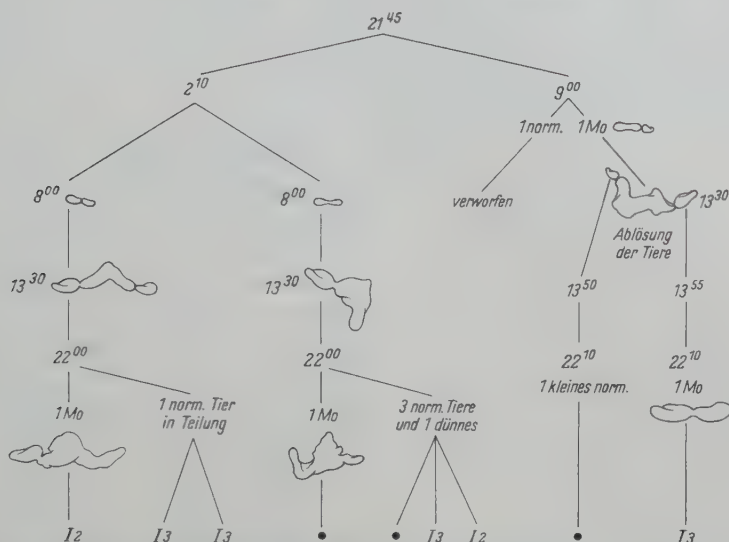


Abb. 4. Expansionsversuch, Erklärung s. Text. Die Bewertungszeichen I, usw. sind in Tabelle 1 erklärt

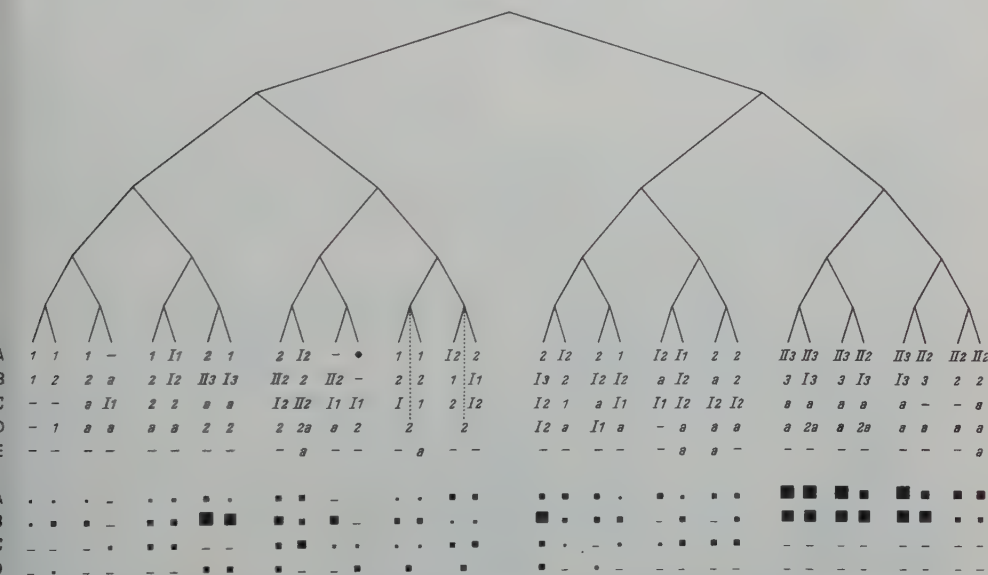


Abb. 5. Expansionsversuch. Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse entspricht das kleinste Quadrat einem Minimum von 5 unvollendeten Teilungen. Der kleinste Wert mußte aus Gründen der Sichtbarkeit mit einer um 25 % überhöhten Seitenlänge gezeichnet werden.

zeigen ein ganz wesentliches Merkmal des Mo-Stammes: *die inäquale Verteilung eines die Mo-Bildung verursachenden Agens in quantitativer und, wie es scheint, auch in qualitativer Hinsicht.*

Das Resultat der Expansionsversuche läßt sich in 3 Punkten zusammenfassen:

1. Die einzelnen Starttiere zeigen ein sehr unterschiedliches Vermögen zur Bildung von Monstra innerhalb des beobachteten Zeitraums. Die Extremfälle stellen das Starttier von Abb. 4 mit sehr bald einsetzender Mo-Bildung und Tier E aus Abb. 5, das keine Monstra bildete, dar.

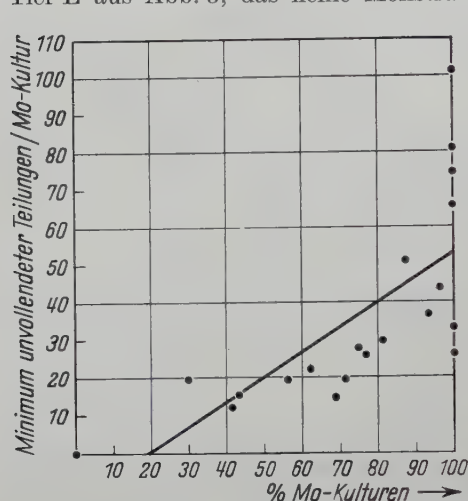


Abb. 6. Die Korrelation zwischen der Frequenz der Mo-Kulturen in einer Nachkommenschaft und der Stärke der Mo-Bildung innerhalb einer Mo-Kultur

2. Die inäquale Verteilung der Manifestationsstärke bei den einzelnen Teilungsschritten wird durch die in Abb. 5 gegebenen Beispiele A, B, C, D demonstriert. Dabei sind die Kulturen mit dem Mo-Wert 0 nicht als qualitativ verschieden von den Mo-haltigen Kulturen zu betrachten, denn reisolziert man aus ihnen — auch von denen aus Beispiel E — bekommt man wieder, freilich zunächst nur schwache, Mo-Bildung.

3. Zwischen der Häufigkeit Mo-haltiger Kulturen in einer Klonnachkommenschaft und der Stärke der Mo-Bildung in einer Monstra-haltigen Kultur besteht eine positive Korrelation. Das zeigt schon der Vergleich der zahlenmäßigen Wertungen in den einzelnen Beispielen der Abb. 4 und 5.

Aus 20 in dieser Hinsicht auswertbaren Versuchen erhält man den Korrelationskoeffizienten $r = +0,715$. Nach KOLLERS Tafeln liegt die Zufallsgrenze für $m = 18$ bei 0,634, die positive Korrelation ist statistisch gesichert. Graphisch ist diese Beziehung in Abb. 6 dargestellt.

Tabelle 2. Die Teilungsraten in Normal- und Mo-Stämmen

Stamm	Zahl der ausgewerteten Kulturen	Teilungen nach 30 Std	σ	Stamm	Zahl der ausgewerteten Kulturen	Teilung nach 30 Std	σ
51,7 K	15	6,98	0,05	L ¹ (Mo VIII K)	15	5,45	1,29
51,7 K	15	6,92	0,32	V ¹ (Mo VII K)	14	5,74	0,88
51,7 K	15	6,97	0,03	V ¹ (Mo VII K)	15	5,77	0,31
51,7 K	15	6,86	0,09	E ¹ (Mo VIII K)	15	3,61	0,45
d-4-6-VIII	30	6,96	0,07	E ¹ (Mo VIII K)	15	4,78	0,16
16 ¹ (ex Mo VII kk)	15	6,47	0,32	E ¹ (Mo VIII K)	15	4,43	0,34
16 ¹ (ex Mo VII kk)	30	6,87	0,01	E ¹ (Mo VIII K)	15	3,82	0,55
				E ¹ (Mo VIII K)	15	3,55	0,80

¹ Stamm 16 ist ein F₂-Klon aus Kreuzung 2, Paar 5. Von dem ursprünglichen Mo-Klon wurde eine „normale“ Linie selektioniert, daher „ex Mo“ (s. die Selektionsversuche S. 411 ff.). L, V und E sind verschiedene aus Kreuzung 1 stammende Mo-Linien.

b) Die Teilungsraten der Mo-Stämme. Mo-Kulturen zeigen geringere Teilungsraten als normale, und zwar ist die Herabsetzung der Teilungsrate um so

merklicher, je mehr Monstra gebildet werden. In Tabelle 2 sind die Teilungsraten mit ihrer mittleren Abweichung (σ) von Normal- und Mo-Stämmen verglichen.

15 bzw. 30 Tiere aus einer Kultur wurden einzeln isoliert und nach 30 Std die Zahl der vorhandenen Tiere in allen Kulturen ausgezählt. Daraus wurden nach $N = 2^n$ die durchlaufenen Teilungen und die zugehörigen Werte der mittleren Abweichung berechnet. Auf strenge Vergleichbarkeit der äußeren Bedingungen, auch hinsichtlich des zeitlichen Abstandes von der letzten Autogamie, wurde geachtet.

Neben den geringeren Teilungsraten der Mo-Stämme fallen auch deren höhere σ -Werte auf. Nach den Ergebnissen der Expansionsversuche ist das

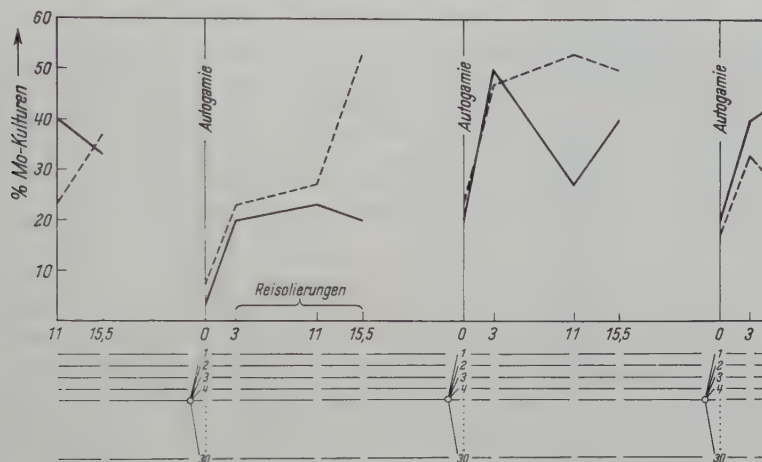


Abb. 7. Der Einfluß der Autogamie auf die Manifestation des Mo-Charakters. Unter der Abszisse ist das Reisolierungsschema gezeichnet

zu erwarten. Entsprechend seinen hohen Mo-Werten zur Zeit der Untersuchung zeigt Stamm E auch die niedrigsten Teilungsraten. Die negative Korrelation zwischen Mo-Bildung und Teilungsrate wurde bei den Selektionsversuchen (s. S. 411 ff.) ausgenutzt.

c) *Äußere und innere Einflüsse auf die Manifestation des Mo-Merkmales.* Mo-Stämme produzieren in „slide“-Kulturen wesentlich mehr Monstra als in Röhrenkulturen. Auch ist nach Übertragung von Tieren aus Röhren in „slides“ die volle Manifestationsstärke erst nach 1—3 Reisolierungen in „slides“ erreicht. Die Ursachen dafür sind unbekannt.

In autogamen Isolierungen ist die Mo-Bildung wesentlich geringer als in den der Autogamie folgenden. Abb. 7 zeigt den Einfluß der Autogamie auf die Manifestation des Merkmales. Die Abstände auf der Abszisse entsprechen den zwischen den einzelnen Reisolierungen durchlaufenen Teilungen. Jede autogame Isolierung ist als 0-Punkt genommen. Auf der Ordinate ist die Fraktion der Kulturen mit Monstra aufgetragen. Die dazugehörige Legende macht das Reisolierungsschema für jede Autogamieperiode klar. Es sei gleich vorausgenommen, daß diese Feststellungen für alle Mo-Stämme gelten, gleichgültig ob sie das induzierende Gen (*ds/ds*) haben oder nicht.

Die Kreuzungen

Der Mo-Stamm wurde zuerst mit 51, VII K gekreuzt, um *Kappa* als Markierung in den Mo-Stamm einzuführen. Zur Methodik ist noch zu sagen, daß in F_1 täglich reisoliert wurde, um Autogamie zu verhindern, in F_2 dagegen jeden 2. Tag. Das auf S. 399 geschilderte Bewertungssystem kam bei dieser Kreuzung noch nicht in Anwendung. F_2 -Analysen wurden an 6 Paaren durchgeführt, das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3. Kreuzung 1: 51, MO VIII S (KK) $\times$ 51, VII K (KK)

Paar	Exkonjuganten	Paarungstyp	Trennungsintervall in min	F_1				F_2				
				Phänotyp des Exkonjuganten	Isolierungszyklen	Gesamtzahl der Kulturen ¹	Zahl der Mo-Kulturen ¹	Mo-Klone ¹	Klone ohne Mo-Bildung ¹	Isolierungszyklen	Gesamtzahl der Kulturen ¹	% der Mo-Kulturen
1	1 A	VII	56	Killer	9	36 ²	1	2 ³	27	10	259	0,8
	1 B	VIII		Killer	9	36 ²	36	28	1	6	131	86,3
2	2 A	VII	5	Killer	9	36 ²	—	14	16	7	194	13,4
	2 B	VIII		Killer	9	28 ²	—	9	20	6	165	13,9
3	3 A	VII	8	Killer	9	9	2	16	13	7	197	23,4
	3 B	VIII		Killer	9	9	4	11	17	7	194	20,6
10	10 A	VII	8	Killer	9	9	9	14	10	7	139	22,3
	10 B	VIII		Killer	9	9	4	10	18	7	180	9,4
11	11 A	VII	43	Killer	9	9	—	4 ⁴	26	10	288	1,4
	11 B	VIII		Killer	9	9	9	30	—	6	160	78,8
15	15 A	VIII	20	Killer	9	9	1	11	12	7	105	14,3
	15 B	VII		Killer	9	9	—	10	16	7	159	13,8

¹ Wegen des Gebrauches der Begriffe „Klone“ und „Kulturen“ s. die Legende zur Abb. 7. Dort sind in jeder Autogamieperiode 30 Klone vorhanden, aus jedem Klon wurde 3mal reisoliert, das ergibt zusammen mit der exautogamen Isolierung 120 Kulturen.

² Von Paar 1 und 2 wurden von jedem Exkonjuganten die Produkte der ersten beiden Teilungen getrennt als Reisolierungslinien in F_1 geführt.

³ Mo-Bildung sehr schwach.

⁴ Von den 4 Klonen war bei 3 die Mo-Bildung sehr schwach.

Die Paarungstypen geben an, aus welchem Elter der betreffende Exkonjugant hervorgegangen ist. Nach SONNEBORNS Erfahrungen an *Kappa* (SONNEBORN 1947) ist bei der Konjugation die Wahrscheinlichkeit für *Kappa*-Übertragung um so größer, je länger das Intervall der Trennung des Paares an der Festhalte-Region („holdfast region“) und am paroralen Kegel („paroral cone region“) ist. Die Trennungsintervalle variieren von 5—56 min, *Kappa* wurde in allen Fällen übertragen, wie aus der nächsten Spalte hervorgeht (Phänotyp des Exkonjuganten). Sind sich darin alle Paare gleich, so unterscheiden sie sich in der Mo-Bildung zum Teil erheblich.

Alle Exkonjuganten der Paare 2, 3, 10, 15 geben in F_2 eine monohybride Spaltung Mo:Normal=1:1. In F_1 sind aber merkliche Unterschiede zwischen den Paaren vorhanden. Die zugehörigen Exkonjuganten gleichen sich zwar, aber bei Paar 2 werden in F_1 überhaupt keine, bei Paar 15 fast keine und bei den Paaren 3 und 10 häufiger Monstra gebildet. Alle Tiere eines jeden Kreu-

zungspartners müssen identische Genome haben, denn sie sind jeweils aus einem einzigen autogamen Tier durch etwa 10 Teilungen hervorgegangen. Nun zeigen die spaltenden Paare 2, 3, 10, 15 trotz der geforderten Identität der Zygotenkerne schon eine verschieden starke Mo-Bildung in F_1 . Dieses Faktum wie auch das vegetative Verhalten des Mo-Stammes (s. besonders die Expansionsversuche) legt die Annahme einer plasmatischen Beteiligung an der Ausprägung des Mo-Merkmales nahe.

Ganz abweichend verhalten sich dagegen die Paare 1 und 11: sowohl in F_1 wie F_2 gleichen die Exkonjuganten dem Stamm, aus dem sie hervorgegangen sind. Obwohl bei den Exkonjuganten 1A und 11A in F_2 Monstra in geringer Zahl und schwacher Ausprägung auftreten, kann nach den in der Tabelle angegebenen Zahlen von einer Aufspaltung in F_2 keine Rede sein. Die Vererbung des Mo-Merkmals scheint hier rein plasmatisch bedingt zu sein. Leider mangeln den Kreuzungspartnern geeignete Markierungsgene, deren Aufspaltung den schlüssigen Beweis liefern könnte, daß auch bei der Konjugation der Paare 1 und 11 tatsächlich Kernaustausch stattgefunden hat. Es wurde zwar *Kappa* von einem Konjuganten in den anderen übertragen, aber nach SONNEBORN (persönl. Mitteilung) kommt das auch vor, ohne von Kernaustausch begleitet zu sein.

Aus Kreuzung 1 erhalten wir also verschiedene Linien 51 Mo K von beiden Paarungstypen und das Ergebnis, daß die Mo-Bildung einerseits von einem Gen bedingt wird, andererseits aber auch vom Plasma abhängt. Nun können die Mo K (*KK*)-Linien mit d-4-6 (*kk*) gekreuzt werden, wo die Spaltung der Markierungsgene *K*—*k* die sichere Grundlage für die Beurteilung der Kreuzungsergebnisse liefert.

Für die folgenden Kreuzungen wurden die aus Kreuzung 1 stammenden Linien 15 B-1 = 51 Mo VII K (*KK*) und 1 B-29 = 51 Mo VIII K (*KK*) als Mo-Eltern verwendet.

Nach der Trennung der Paare wurde jeder Exkonjugant in rasch aufeinander folgenden Passagen 5mal in erschöpftem Medium „gewaschen“ und anschließend mindestens 12 Std darin belassen. Die erste Teilung des Exkonjuganten sollte dadurch verzögert werden, um allenfalls übertragene *Kappa*-Partikeln Chance zur Vermehrung vor der ersten Teilung des Tieres zu geben. Um möglichst genau die Mo-Bildung in F_1 zu erfassen, wurde mit einer Ausnahme (Kreuzung 5, Paar 11) die F_1 durch zahlreichere Isolierungen „verbreitert“. Bei den Paaren 5 und 7 der Kreuzung 2 durchlief jeder Exkonjugant zunächst 6 Teilungen nach dem Expansionschema, so daß von jedem Exkonjuganten 64 Kulturen vorhanden waren, aus denen reisoliert wurde. Das Vorkommen von Monstra in den Kulturen wurde nach dem in Tabelle I beschriebenen System registriert. Die F_2 wurde stets aus Kulturen isoliert, deren Tiere sich zu 100% im Klimaxstadium der Autogamie befanden. Dadurch ist Genotypenselektion bei der Isolierung der F_2 -Tiere ausgeschaltet.

Die Resultate der Kreuzungen sind in den Tabellen 4a und b und graphisch in Abb. 8 dargestellt.

In der Tabelle 4a ist die zahlenmäßige Übersicht über die gesamte F_1 und F_2 gegeben, während die zugehörige Tabelle 4b die F_2 -Spaltung für Mo-Normal und Killer: Sensitiv zeigt. Im Verlauf der Reisolierungen in F_2 gingen einige Linien durch zufallsgemäße Isolierung vitalitätsgeschwächter Tiere verloren. Für die Auswertung in der Tabelle 4b wurden nur die Klone berücksichtigt, die bei der letzten Reisolierung noch vorhanden waren. Eine Überalterung der F_2 -Klone wurde durch Einschaltung von Autogamie bei den über längere Zeit geführten Nachkommenschaften verhindert (bei Paar 7 am 16., bei Paar 6 am 12., bei Paar 8 am 17. und bei Paar 11 am 16. Tag nach Beginn der F_2). Ein Vergleich zwischen

den F_2 -Werten für Mo-Normal und den zugehörigen P -Werten in den Tabellen 4a und 4b ergibt Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden der Auswertung.

Aus den Tab. 4a und 4b sind folgende Fakten ersichtlich:

1. Alle Kreuzungen sind korrekt, jeder Killer-Exkonjugant spaltet in F_2 Killer:Sensitiv = 1:1.

2. Die einzelnen Paare und auch die Exkonjuganten eines Paares unterscheiden sich bezüglich der Mo-Bildung erheblich. Dabei erfolgt die Übertragung des die Mo-Bildung verursachenden Faktors unabhängig von der

Tabelle 4b

	Mo K	Mo S	—K	—S	P (für Mo: Normal = 1:1)	Killer: Sensitiv
5A VIII	—	41	—	9	< 0,001	
5B VII	20	20	6	9	< 0,001	26:29
7A VII	11	10	14	10	0,66	25:20
7B VIII	11	13	10	7	0,43	21:20
6A VII	15	13	7	12	0,19	22:25
6B VIII	—	17	—	23	0,34	
11A VII	—	25	—	12	0,032	
11B VIII	9	11	5	6	0,11	14:17
8A VIII	8	9	12	14	0,17	20:23
8B VII	10	12	7	4	0,051	17:16
20A VII	10	10	7	9	0,5	17:19
20B VIII	10	10	4	2	0,006	14:12

Übertragung von *Kappa* (s. Paar 5) und nicht etwa im Sinne einer mütterlichen Vererbung vorzugsweise oder ausschließlich auf die aus dem Mo-Elter hervorgegangene Nachkommenschaft. Gerade das Umgekehrte kann der Fall sein, wie das Beispiel von Kreuzung 8 zeigt: in den F_1 -Kulturen des aus dem Mo-Elter kommenden Exkonjuganten vom Paarungstyp VIII treten keine

Monstra auf, dagegen ziemlich häufig in dem aus dem d-4-6-VII-Elter hervorgegangenen Kulturen.

3. Die Spaltung Mo:Normal stimmt bei allen Paaren mit Ausnahme von Paar 5 mit dem erwarteten 1:1-Verhältnis $\pm$ gut überein. Die Schwankungen sind beträchtlich größer als für die Spaltung Killer:Sensitiv.

4. Im gesicherten Widerspruch zur 1:1-Spaltung Mo:Normal steht die F_2 von Paar 5. Beide Exkonjuganten zeigen in F_2 einen wesentlich höheren Prozentsatz von Mo-Klonen als mit einer monohybriden Spaltung vereinbar ist. Dazu muß nochmals betont werden, daß die Mo-Eltern bei den Paaren 5 und 7 Schwestertiere aus der gleichen Kultur sind.

5. Die Unabhängigkeit der K/k -Spaltung von der Spaltung für Mo:Normal ist aus Tabelle 4b so evident, daß auf die Berechnung der P -Werte für Unabhängigkeit der beiden Spaltungen verzichtet werden kann.

6. Die Expressivität des Mo-Merkmals in F_2 ist in den beiden letzten Spalten der Tabelle 4a als Prozent Mo-Kulturen, bezogen auf die Gesamtzahl der F_2 -Kulturen und als durchschnittliches Minimum unvollendeter Teilungen je Mo-Kultur, angegeben. Die einzelnen Nachkommenschaften zeigen recht verschiedene Werte. Darauf wird im Anschluß an die Besprechung der Abb. 8 zurückzukommen sein (s. Abb. 9 und 10).

Mehr als die summarische Darstellung in der Tabelle sagt jedoch die Abb. 8 über das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Paare und Exkonjuganten in F_2 aus. Die graphische Darstellung zeigt zu jeder Reisolierung der F_2 den

Prozentsatz der bis zu diesem Zeitpunkt festgestellten Mo-Klone, bezogen auf die Gesamtzahl der lebenden Klone. Die Endpunkte der Kurven in der

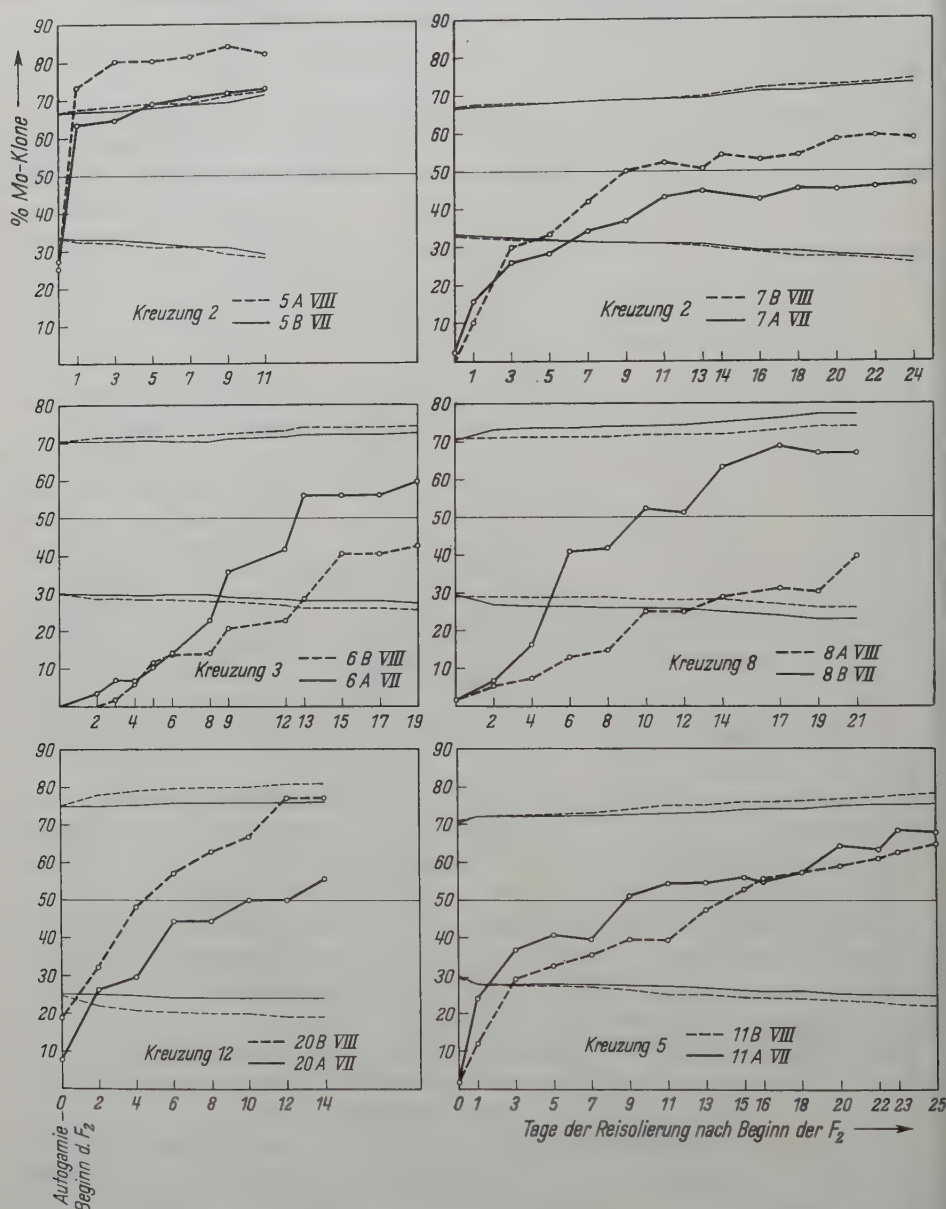


Abb. 8. Die Manifestation des Mo-Merkmales in den F₂-Klonen in Abhängigkeit von der Dauer der F₂

Abb. 8 entsprechen also den Zahlen der Tabelle 4b. Die Kurven geben für jede Exkonjuganten-Nachkommenschaft den zeitlichen Verlauf der Mo-Manifestation wieder.

In jedem Koordinatensystem ist die Erwartung für 50% eingezeichnet und spiegelbildlich dazu dünn ausgezogen für jede Exkonjuganten-Nachkommenschaft die für deren

jeweilige Klonzahl erlaubten maximalen Abweichungen. Die Überschreitungswerte wurden aus KOLLER (1943) Tafel 3 abgelesen.

Allen Kurven gemeinsam ist der Sättigungscharakter. Sie unterscheiden sich in ihrem Startniveau, damit zusammenhängend auch in ihrer Neigung zu Beginn der F_2 und im Zeitpunkt der Sättigung. Nach der Ähnlichkeit der Kurven kann man die einzelnen Nachkommenschaften gruppieren (Abb. 9).

Unter jedem Kurventyp stehen die ihm entsprechenden Exkonjuganten-Nachkommenschaften. Die nächste Zeile bringt als Maß für die anfängliche Neigung der Kurve für jede Nachkommenschaft die Zahl der durchlaufenen Teilungen bis zu jener Reisolierung, wo die Prozentsätze der festgestellten Mo-Klone die untere Grenze des Wahrscheinlichkeitsbereiches einer monohybriden Spaltung überschreiten. Bei 2tägigem Reisolierungs-

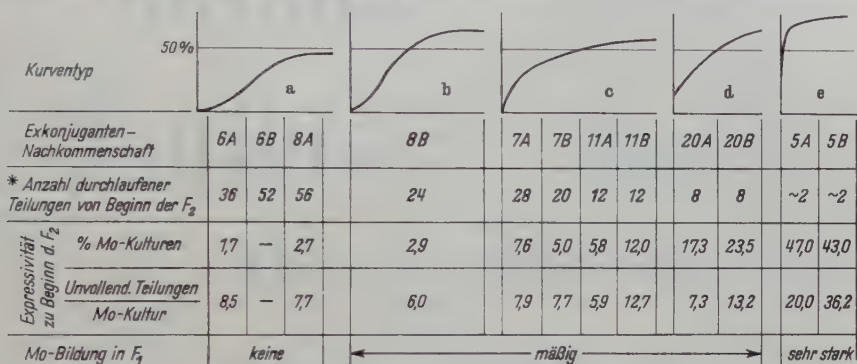


Abb. 9. Erklärung s. Text

* Anzahl durchlaufener Teilungen von Beginn der F_2 bis zu dem Zeitpunkt, wo die Häufigkeit festgestellter Mo-Klone in den Wahrscheinlichkeitsbereich einer monohybriden Spaltung fällt

zyklus können durchschnittlich 4 Teilungen je Tag angenommen werden. Die zu Beginn der F_2 vorhandene Expressivität des Mo-Merkmals ist in den beiden nächsten Zeilen als Prozent Mo-Kulturen (nicht Mo-Klone!) und Minima unvollendeter Teilungen je Mo-Kultur angegeben. Dazu wurden die Werte der ersten beiden Isolierungen zusammengezogen, denn nach den in Abb. 7 dargestellten Erfahrungen ist die Manifestation des Mo-Charakters in exautogamen Isolierungen stets geringer als in den der Autogamie folgenden. In der letzten Zeile ist für jede Nachkommenschaft die in F_1 beobachtete Mo-Bildung angegeben.

Die Übersicht zeigt ganz klar, daß die Kurven b—e nichts anderes als immer später einsetzende Ausschnitte aus der Kurve a darstellen. Mit anderen Worten: Die Nachkommenschaften, deren F_2 durch die Kurven b—e wiedergegeben ist, haben schon von Beginn an eine Fähigkeit zur Mo-Bildung, und zwar in zunehmendem Maße von b—e, die bei denen vom Kurventyp a erst später erreicht wird. Der Zusammenhang mit der Mo-Bildung in F_1 ist unverkennbar (s. auch Tabelle 4a): 6A, 6B und 8A bilden in F_1 auch unter zahlreicheren Isolierungen keine Monstra, während die anderen Nachkommenschaften Monstra schon in F_1 zeigen, am meisten wiederum 5A und 5B. Die Nachkommenschaft 11A hat zwar keine Monstra in F_1 und die F_2 verläuft nach Kurve c, aber die Zahl geprüfter F_1 -Kulturen ist zu gering, um darin einen Widerspruch zu der festgestellten Beziehung zwischen der Mo-Bildung in F_1 und F_2 zu sehen.

Verfolgt man die Expressivität allein ausgedrückt als durchschnittliches Minimum unvollendeter Teilungen je Mo-Kultur in den einzelnen Isolierungszyklen der F_2 am folgenden Diagramm (Abb. 10, Abszisse: Tage nach Beginn

der F_2 , Ordinate: Minimum unvollendeter Teilungen je Mo-Kultur), so erhält man die gleiche Gruppierung der Nachkommenschaften nach ihrer Ähnlichkeit wie beim Vergleich der Kurven für die Spaltung. Die letzte Spalte der Tabelle 4a zeigt, wie verschieden das durchschnittliche Niveau bei den einzelnen Nachkommenschaften ist. Im Diagramm finden wir zu Beginn der F_2 wieder die höchsten Werte bei 5A und 5B; ansteigende Werte bei 7A, 7B, 11A und 11B, ziemlich gleichmäßig niedere bei 6A, 6B, 8A, 8B und mittlere

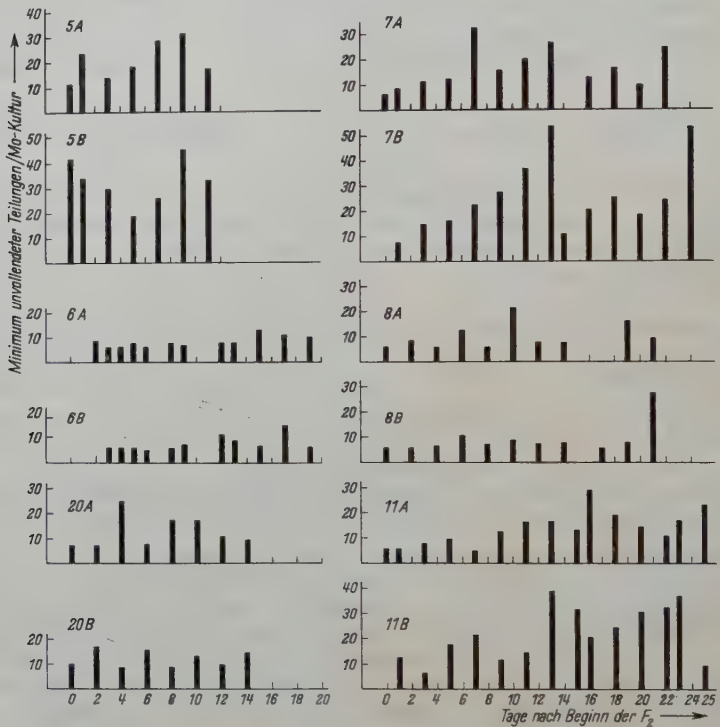


Abb. 10. Die durchschnittliche Stärke der Mo-Bildung je Mo-Kultur zu den verschiedenen Isolierungsdaten der F_2 .

Werte ohne auffällige Gipfel bei 20A und 20B. Die Ähnlichkeit zwischen den Paaren 7 und 11 bzw. 6 und 8 drückt sich auch in diesen Diagrammen aus.

Den im Anschluß an die Tabellen 4a und 4b angeführten Befunden ist als wesentliches Ergebnis der Kurvenanalyse hinzuzufügen, daß der Beginn der Mo-Manifestation in F_2 mit der Mo-Bildung in F_1 zusammenhängt. Bei Exkonjuganten-Nachkommenschaften, die in F_1 keine Monstra gebildet haben, wird in F_2 bei den meisten Klonen die Fähigkeit zur Mo-Bildung so spät manifest, daß eine Spaltung erst nach mehr als 50 Zellgenerationen faßbar wird!

Alle Befunde über das Verhalten des Mo-Stammes bei vegetativer Vermehrung und in den Kreuzungen lassen sich widerspruchslös durch die folgende Hypothese erklären:

Der Mo-Stamm unterscheidet sich vom Normal-Stamm durch ein rezessives Gen *ds* (*defectionem separationis inducens*). Dieses Gen induziert in

plasmatischen Strukturen¹ in nicht näher bestimmbarer aber offenbar geringer Häufigkeit einen irreversiblen Defekt. Die plasmatischen Strukturen müssen eine gewisse genetische Kontinuität besitzen und in Vielzahl vorhanden sein; ihre normale Funktion ermöglicht die Durchschnürung bei der Zelltrennung. Es liegt nahe, den Sitz dieser Strukturen im Ektoplasma anzunehmen; dafür spricht auch die Unabhängigkeit der Übertragung von Mo-Plasma und *Kappa* bei der Konjugation. Eine Zelle des Normal-Stammes hat viele solcher Strukturen, die alle voll funktionsfähig sind, die Zelltrennung ist nicht gestört. Eine Zelle aus dem Mo-Stamm hingegen hat entweder nur normale oder, und das dürfte häufiger der Fall sein, ein Gemisch von voll funktionsfähigen und genetisch abgeänderten, defekten Strukturen. Ob und in welcher Häufigkeit es dann zur Mo-Bildung kommt oder nicht, hängt davon ab, wieviele defekte Strukturen an den Orten vorhanden sind, wo die Trennung der Zellen erfolgt.

Ist die vorgetragene Hypothese richtig, dann müßten unter den Mo-Klonen der F_2 vom Paar 5 nur etwa die Hälfte das induzierende Gen ds/ds haben und die anderen lediglich das Mo-Plasma. Bei den Mo-Klonen, die nur im Plasma ein Gemisch normaler und defekter Strukturen und nicht das induzierende Gen ds/ds haben, müßte durch fortwährende Selektion auf „normal“ die Fähigkeit zur Mo-Bildung verlorengehen. Bei den Mo-Klonen der Konstitution ds/ds dagegen müßte Selektion erfolglos bleiben. Die Selektionsversuche haben tatsächlich diese Voraussage erfüllt.

Das entscheidende Faktum für die Annahme einer genetischen Kontinuität der postulierten plasmatischen Strukturen ist der hohe Überschuß an Mo-Klonen in der F_2 vom Paar 5. Der Einfluß des Plasmas war in diesem Fall so klar, daß bei den späteren Kreuzungen vor allem die reine Spaltung untersucht werden sollte. Darum wurden bei den Kreuzungen 3, 5, 8, 12 aus insgesamt 30 in F_1 beobachteten Paaren diejenigen für die Untersuchung der F_2 ausgewählt, die keine oder nur relativ wenige Monstra in F_1 zeigten (das waren die Paare 6, 11, 8, 20).

Eine Deutung des Überschusses an Mo-Klonen in der F_2 vom Paar 5 im Sinne einer Prädetermination ist ausgeschlossen. Von 5A und 5B wurden 14 Mo-Klone in Strohmedium (Dauerkultur mit sehr geringer Vermehrungsrate) aufbewahrt und später in Reisolierungslinien durch mehrere Monate (in allen Fällen über 300 Zellgenerationen) weitergeführt. Etwa nur die Hälfte der Klone kann das Gen ds haben, aber alle behielten den Mo-Charakter bei und noch mehr: zu jedem Zeitpunkt konnte in allen Klonen die Mo-Bildung durch Selektion enorm verstärkt werden.

Die Selektionsversuche

Die Selektionsversuche wurden an verschiedenen aus der F_2 von Kreuzung 1 und 2 stammenden Mo-Linien durchgeführt. Die einzelnen Linien sind der Einfachheit halber mit Buchstaben bzw. Zahlen bezeichnet, und zwar stammen aus Kreuzung 1 die Linien: A, B, C aus der F_2 von 1B (C=1B-29, das ist der Mo-Elter in den Kreuzungen 5, 8, 12); E, F aus der F_2 von 2B; L, M, Q aus der F_2 von 11B; S, V aus der F_2 von 15B (S=15B-1, das ist der Mo-Elter in den Kreuzungen 2 und 3); aus Kreuzung 2, Paar 5 die Linien: 1—8 aus der F_2 von 5A; 9, 11, 12, 14—16 aus der F_2 von 5B.

¹ Der Ausdruck Struktur oder Partikel ist neutral gemeint. Über die Größenordnung der Strukturen können zur Zeit noch keine Vermutungen geäußert werden.

Zuerst wurde versucht, durch stetige Auswahl von Kulturen mit der geringsten Mo-Bildung für die nächste Isolierung die Selektion auf „normal“ zu betreiben. Das ist zwar ein effektives, aber auch ein recht mühseliges Verfahren. Denn um ein einigermaßen verlässliches Bild zu erhalten, müssen je Stamm jedes Mal mindestens 60 Isolierungen gemacht und dann auf ihren Gehalt an Monstra geprüft werden, und insgesamt waren 24 Stämme auf den Erfolg oder die Erfolglosigkeit einer Selektion in Richtung „normal“ zu untersuchen. Immerhin vermögen diese Versuche die Beeinflussung der Mo-Bildung durch Selektion sehr anschaulich zu demonstrieren. Ein kleiner Ausschnitt von vielen Beispielen genügt (Tabelle 5). Die Tabelle zeigt zum einen, wie

Tabelle 5

Linie	Mo-Kulturen am 13. 8. in %	Reisolierungen am 13., 15., 17., 19. 8., jedesmal von der normalsten Kultur	Mo-Kulturen am 22. 8. in %	Reisolierungen am 22., 24., 26. 8., jedesmal von der normalsten Kultur	Mo-Kulturen am 29. 8. in %	Mo-freie Kulturen in Röhrchen mit Stroh- medium (2 Monate)	Isolierung am 29. 10. in „slides“ und Reisolierung ergab % Mo-Kulturen
A	88		0		0		90
B	100		64		0		4
C	100		8		3		10
3	38		0		0		3
5	98		33		24		59
15	95		16		0		8
16	96		0		2		13

schnell durch Selektion der Mo-Spiegel gesenkt wird, und zum anderen, wie bei Wegfall von Selektion in Dauerkulturen der Mo-Spiegel wieder ansteigt.

Auch die Selektion bei einem nach dem Expansionsschema modifizierten Verfahren erfordert für 24 zu prüfende Linien einen zu großen Arbeitsaufwand. Darum wurde schließlich von der auf S. 402 geschilderten inversen Beziehung zwischen Mo-Bildung und Teilungsrate Gebrauch gemacht.

Eine Mo-Kultur stellt nach unserer Hypothese ein Gemisch von Tieren mit unterschiedlichem Anteil defekter Strukturen dar. Die Teilungsraten eines Tieres werden um so normaler sein, d.h. höher liegen, je weniger defekte Strukturen vorhanden sind. Durch längere Selektion auf höhere Teilungsraten muß es gelingen, die „Konzentration“ defekter Partikel in einer Population praktisch auf 0 zu senken. Dazu braucht man aber nichts weiter zu tun, als die zu prüfenden Linien in Röhrchen bei maximalen Teilungsraten zu kultivieren. Alle 24 Std wurde ein Teil der Population in ein anderes Röhrchen übertragen und mit frischem Medium für 6 Teilungen je Tag gefüttert. Wöchentlich wurde durch einmaliges Aussetzen der Fütterung Autogamie in den Kulturen induziert. Es ist klar, daß bei solchem Verfahren der Anteil von Tieren mit rascheren Teilungsraten, also mit weniger defekten Strukturen, in der Population von selbst ansteigen muß. Der Versuch wurde über rund $3\frac{1}{2}$ Monate geführt; das entspricht bei Berücksichtigung der Verlangsamung durch Autogamie etwa 450 Zellgenerationen. Nur drei Linien: B, M, V, wurden erst später in das Experiment einbezogen, deren Versuchsdauer erstreckt sich nur über 250 Teilungen. Zur Kontrolle des Fortschrittes der Selektion in der Richtung „normal“

wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Röhren je 60 Tiere einzeln isoliert und in den daraus erwachsenen Kulturen die Stärke der Mo-Bildung bewertet.

Der erste Abschnitt der Tabelle 6 zeigt das Ergebnis („Mo“ bedeutet Mo-Bildung beobachtet, „—“ bedeutet keine Monstra gefunden). Etwa 250 Zellgenerationen nach Beginn des Versuches waren nur noch bei 6 Linien (E, F, V, 4, 5, 9) unter je 60 Kulturen Monstra nachweisbar. Am Ende des Versuches nach 450 Zellgenerationen wurden von jedem Stamm 60 Tiere isoliert und nach 8 Teilungen daraus reisoliert. Unter je 120 geprüften Kulturen war kein einziges Monstrum festzustellen.

Von entscheidender Bedeutung ist aber der Erfolg einer Reselektion zur Mo-Bildung. Denn von den 14 Linien aus dem Paar 5 müßten etwa die Hälfte das Gen *ds/ds* haben und wieder zur Mo-Bildung gebracht werden können. Dagegen dürfte der andere Teil der Linien mit dem Normal-Allel keine Monstra mehr bilden können, wenn die Selektion erfolgreich war und die defekten Strukturen aussortiert wurden. Zur Selektion auf Monstra wird stets aus solchen Kulturen reisoliert, die auch nur Anzeichen einer Mo-Bildung zeigen. Diese sind auch bei Normal-Stämmen zu finden, aber dort bleibt Selektion erfolglos (s. Fußnote zu Tabelle 1).

Insgesamt wurden 3 solcher Gegenexperimente unternommen, deren Ergebnisse im 2.—4. Abschnitt der Tabelle 6 dargestellt sind. Der erste Gegenversuch wurde an solchen Linien, die nach der etwa 250 Zellgenerationen währenden Selektion auf „normal“ keine Monstra mehr zeigten, durchgeführt. Wir sehen, daß A, C, L, 2, 7, 8, 11 und 12 wieder Monstra bilden, während Q, 1, 3, 6, 14, 15 und 16 normal bleiben. Die Versuchsdauer erstreckte sich über 110 Zellgenerationen.

Der zweite Versuch zur Reselektion wurde unmittelbar nach Beendigung der Selektion auf hohe Teilungsraten begonnen. Die Stämme, die in diesem 2. Versuch wieder Monstra bildeten, brauchten nicht mehr weiter geprüft zu werden. Von ihnen wird angenommen, daß sie das induzierende Gen *ds/ds* besitzen und darum die Selektion auf „normal“ erfolglos blieb. Für den 3. und letzten Versuch zur Reselektion auf Mo-Bildung wurden alle die Linien nochmals herangezogen, die in den vorangegangenen Experimenten keine oder nur fragliche Mo-Bildung zeigten. Für diese Linien war eine nochmalige Überprüfung aus zwei Gründen wünschenswert. 1. Die Linien 1, 3, 6, 14, 15, 16 konnten im zweiten Versuch nur über 16 Zellgenerationen bzw. in je 180 Isolierungen beobachtet werden (wegen begrenzter Arbeitskapazität). 2. In früheren Versuchen wurde beobachtet, daß nach Selektion in Richtung normal der Mo-Spiegel in Dauerkulturen wieder ansteigt (s. Tabelle 5). Alle Linien wurden nach Beendigung des Selektionsversuches auf maximale Teilungsraten in Dauerkulturen aufbewahrt. Zwei Monate nach Beendigung der Selektion auf „normal“, wurden die Linien aus den Dauerkulturen für den 3. Versuch zur Reselektion auf Mo-Bildung isoliert. Wie in den vorangegangenen Versuchen blieben frei von Monstra die Linien Q, 1, 3, 6, 8, 9, 15, 16. Etwas überraschend ist das Wiederauftreten von Monstra in Linie 14, die im 1. Versuch zur Gegen-selektion auf Mo-Bildung unter 840 Isolierungen keine Monstra bildete.

Tabelle 6

Linie	Selektion auf schnelle Teilungsraten			1. Gegenversuch			
	Mo-Bildung 200—250 Teilungen nach Beginn des Versuchs	Mo-Bildung am Ende des Versuches (450 Teilun- gen)	Zahl der ausgewerteten Kulturen aus Einzel- isolierung	Klassi- fizierung	Versuchs- dauer in Zell- genera- tionen	Monstra treten auf nach Anzahl Teilungen	aus- ge- wertete Kulturen
A	—	—	780	Mo	110	82	840
B ¹	—	—	420				
C	—	—	840	Mo	110	4	840
E	Mo	—	660				
F	Mo	—	660				
L	—	—	840	Mo	110	30	840
M ¹	—	—	420				
Q	—	—	720	Mo ²	110	4	840
S	—	—	660				
V ¹	Mo	—	360				
1	—	—	660		110	—	840
2	—	—	660	Mo ?	110	56	840
3	—	—	840	—	110	—	840
4	Mo	—	660				
5	Mo	—	780				
6	—	—	660	—	110	—	840
7	—	—	720	Mo	82	1	660
8	—	—	660	Mo	110	30	840
9	Mo	—	660				
11	—	—	660	Mo	110	56	840
12	—	—	660	Mo	110	66	840
14	—	—	720	—	110	—	840
15	—	—	720	—	110	—	840
16	—	—	720	—	110	—	840

¹ B, M, V wurden erst später in den Versuch einbezogen (Gesamtdauer ~250 Teilungen).

² Q im 1. Gegenversuch: 1 schwache Mo-Kultur in der Reisolierung nach Versuchsbeginn, weitere Selektion auf Monstra erfolglos.

Die Tabelle 6 zeigt zwischen den 3 Versuchen zur Reselektion von Monstra gute Übereinstimmung. Daß Linie 8 im 1. Gegenversuch noch Monstra bildete und später keine mehr, ist ohne weiteres verständlich, denn zwischen dem Beginn des 1. und 2. Gegenversuches liegen immerhin ~200 Zellgenerationen, in denen die Selektion auf „normal“ noch wirksam war. Für das Auftreten von Monstra in Linie 14 im 3. Gegenversuch sind verschiedene Erklärungen denkbar: Linie 14 hat das induzierende Gen *ds/ds*, das Ausbleiben von Mo-Bildung im 1. Gegenversuch ist auf effektlose Lage der defekten Strukturen zurückzuführen. 2. Linie 14 hat die Konstitution *Ds/Ds*, während der ganzen Selektion auf „normal“ wurden defekte Strukturen in effektloser Lage mitgeschleppt. 3. Die Mo-Bildung im 3. Versuch zur Reselektion ist weder durch die mutative Wirkung von *ds/ds* auf die Strukturen, noch auf mitgeschleppte defekte Strukturen, sondern auf eine neue spontane Mutation zurückzuführen. Nur neue genetische Untersuchungen könnten zwischen den verschiedenen Möglichkeiten entscheiden.

Aber ein anderer Punkt ist im Zusammenhang mit den Kreuzungsergebnissen hervorzuheben. In Tabelle 6 ist bei jedem Versuch zur Reselektion von Monstra die Zahl der Zellgenerationen (= durchlaufene Teilungen) angegeben, die vom Versuchsbeginn bis zum gesicherten Erstauftreten von Monstra verstrichen sind. Die meisten Werte liegen zwischen 20 und 50 Teilungen.

Tabelle 6

2. Gegenversuch				3. Gegenversuch				Endgültige Klassifizierung
Klassifizierung	Versuchsdauer in Zellgenerationen	Monstra treten auf nach Anzahl Teilungen	ausgewertete Kulturen	Klassifizierung	Versuchsdauer in Zellgenerationen	Monstra treten auf nach Anzahl Teilungen	ausgewertete Kulturen	
Mo	110	32	1080					Mo
Mo	40	32	360					Mo
Mo	50	16	420					Mo
Mo	26	16	240					Mo
Mo	84	76	840					Mo
Mo	50	42	420					Mo
Mo	60	46	660					Mo
—	100	—	750	Mo ³ ??	92	66?	720	—
Mo	100	24	1020					Mo
Mo	24	24	180					Mo
—	16	—	180	—	92	—	720	—
Mo	92	42	900	—	92	—	720	Mo
—	16	—	180	—	92	—	720	—
Mo	84	50	660					Mo
Mo	76	34	720					Mo
—	16	—	180	—	92	—	720	—
Mo ⁴	110	16?	1200	Mo	92	66	720	Mo
—	110	—	1200	—	92	—	720	—
Mo ⁵	110	—	1080	—	92	—	720	—
Mo	60	50	480					Mo
Mo	24	24	240					Mo
—	16	—	180	Mo	82	66	660	Mo
—	16	—	180	—	92	—	720	—
—	16	—	180	—	92	—	720	—

³ Q im 3. Gegenversuch: 1 schwache Mo-Kultur in der Reisolierung nach Versuchsbeginn, weitere Selektion auf Monstra erfolglos.

⁴ Linie 7, 2. Gegenversuch: 1 Mo-Kultur, davon Selektion auf Mo-Bildung erfolglos.

⁵ Linie 9, 2. Gegenversuch: mehrere schwache Ansätze zur Mo-Bildung, keine Verstärkung möglich.

In derselben Größenordnung liegen auch die in Abb. 9 angeführten Zahlen bei den Nachkommenschaften von 6A, 6B, 8A, 8B, 7A und 7B für die vom Beginn der F₂ durchlaufenen Teilungen bis zu dem Zeitpunkt, wo die Manifestation des Mo-Merkmals in so vielen Klonen aufgetreten ist, daß der Prozentsatz von Mo-Klonen in den Wahrscheinlichkeitsbereich einer monohybriden Spaltung fällt.

Überblickt man das Gesamtergebnis, so ist festzustellen, daß von den aus Kreuzung 1 stammenden Linien A, B, C, E, F, L, M, Q, S, V lediglich die Linie Q die Fähigkeit zur Bildung von Monstra verloren hat. Q stammt ebenso wie L und M aus dem Paar 11 von Kreuzung 1, wo ein starker reziproker Unterschied zwischen den Exkonjuganten in F₁ und F₂ festgestellt wurde (s. Tabelle 3). Damit ist sehr wahrscheinlich gemacht, daß beim Paar 11 tatsächlich regelrechte Kreuzung vorgelegen hat und die zu geringe Zahl von Mo-Klonen in der F₂ vom Exkonjuganten 11A auf extrem späte Manifestation des Mo-Charakters in den *ds/ds*-Klonen zurückzuführen ist. (Der Beobachtungszeitraum dieser F₂ erstreckte sich über 80 Zellgenerationen.) Ob dasselbe für Paar 1 zutrifft, muß offen bleiben, denn es wurden daraus nur 3 Linien A, B, C geprüft,

wobei für C von vornherein feststand, daß diese Linie die genische Konstitution ds/ds haben muß, denn sie ist der Mo-Elter für die Kreuzungen 5, 8, 12 (s. Tabelle 4a). E, F, S (S = Mo-Elter in Kreuzung 2 und 3) und V sind herausgespaltene Klone der Paare 2 und 15, erwartungsgemäß blieb bei ihnen die Selektion auf „konstant normal“ ohne Erfolg.

Die aus dem Paar 5 stammenden Linien 1, 2 ... bis 16 zeitigten das vorausgesagte Ergebnis. Die Hälfte von ihnen behielt die Fähigkeit zur Mo-Bildung auch nach lange andauernder Selektion auf „normal“ bei, die andere Hälfte verlor sie.

Naturgemäß ist mit diesen Selektionsversuchen nicht zu beweisen, daß in den normal gewordenen Linien (1, 3, 6, 8, 9, 15, 16) wirklich nichts mehr von defekten Strukturen vorhanden ist. Der Unterschied zu den noch immer Mo-bildenden Linien ist aber so evident, daß die Annahme, den Linien 1, 3, 6, 8, 9, 15, 16 fehle das induzierende Gen für Mo-Bildung, durchaus berechtigt ist. Die noch immer vorhandenen nichtselektionierten Mo-Linien 1, 3, 6, 8, 9, 15, 16, müßten bei Kreuzung mit „Normal“ eine rein plasmatische Vererbung zeigen. Linie 6: Mo VIII S ($Ds/Ds\ kk$) wurde mit 51 VII K ($Ds/Ds\ K/K$) gekreuzt. Das Ergebnis waren trotz langer Beobachtungsdauer (18 Isolierungszyklen über ~ 120 Zellgenerationen) in F_2 mit einer Spaltung unverträgliche Zahlenverhältnisse Mo-Klone:Normal-Klone die beweisen, daß Linie 6 die Fähigkeit zur Mo-Bildung vererbt, auch wenn das induzierende Gen ds/ds durch das Normal-Allel Ds/Ds ersetzt ist.

In F_1 wurden bei keinem Exkonjuganten (je 5 Kulturen beobachtet) Monstra gefunden. Beide Exkonjuganten sind Killer und spalten in F_2 Killer:Sensitiv = 30:30 bzw. 29:25. Das Endergebnis der F_2 war für

	Mo-Klone	Normal-Klone	Zahl der ausgewerteten Kulturen
Exkonjugant A	2	41	1002
Exkonjugant B	4	36	896

Diskussion

Monstra treten bei *Paramaecium* nach allen möglichen, ziemlich unspezifischen Reizen auf: hohe und niedere Temperaturen, verschiedene Chemikalien, mechanische Verletzungen, Röntgenstrahlen usw. rufen modifikative Bildung von Monstra hervor (WICHTERMANN 1953, S. 355ff.). Bei *Colpidium colpoda* konnten durch Wechsel der Futterbakterien, *B. coli* anstatt *B. fluorescens*, kurze Ketten bis zu 4 Individuen erzeugt werden (CHATTON et CHATTON 1923). Über ähnliche Ergebnisse berichtet SONNEBORN (1932). Unseren Resultaten vergleichbare Phänomene sind nur in der Arbeit von R. STOCKING (1915) zu finden. STOCKING erhielt unter verschiedenen Exkonjuganten-Klonen von *Paramaecium caudatum* mehrere Formen von Abnormitäten, darunter Monstra. Meistens waren die Nachkommenschaften der Exkonjuganten eines Paares sehr ähnlich. Einige der abgebildeten Formen entsprechen durchaus denen, die in den hier berichteten Versuchen erhalten wurden. STOCKING versuchte, die Mo-bildenden Linien durch Selektion in normale und Mo-bildende zu zerlegen. Die Autorin berichtet, daß in einigen Linien die Selektion durch wiederholte

Isolierung normaler Tiere erfolglos blieb. Es traten unter den Nachkommen immer wieder Monstra auf. In anderen Fällen war jedoch die Selektion erfolgreich, und die Linien konnten in normale und weiterhin Mo-bildende Sublinien zerlegt werden. Bemerkenswert ist die Angabe, daß die Selektion erst nach einigen Wochen zu merklichen Unterschieden führte. Der Selektionseffekt ist ähnlich den im vorigen Abschnitt berichteten. Reselektion für Mo-Bildung wurde von STOCKING nicht versucht.

Ein vornehmlich Ketten-bildender Stamm, *snaky* genannt, ist von SONNEBORN aus var. 4 von *Paramecium aurelia* isoliert worden. Nach SONNEBORN (persönl. Mitteilung) und eigenen unveröffentlichten Befunden¹ ist zwar auch bei *snaky* die Manifestation des Merkmals variabel, aber in unvergleichlich geringerem Maße als beim Mo-Stamm. *Snaky* bildet im Gegensatz zum Mo-Stamm nur selten Klumpen, und wenn, dann sind auch diese langgestreckt. Man gewinnt beim Vergleich der Phäne den Eindruck, daß wahrscheinlich in beiden Stämmen dieselbe Funktion bei der Durchschnürung gehemmt ist, nur ist die Hemmung bei *snaky* geringer, dafür aber regelmäßiger vorhanden als beim Mo-Stamm. Der *snaky*-Charakter ist durch ein rezessives Gen bedingt. Die F_1 aus Kreuzung mit d-4-6-VIII ist völlig normal, und in F_2 sind schon in der ersten exautogamen Isolierung 50% der Kulturen *snaky* und 50% normal. (SONNEBORN persönl. Mitteilung und MALY unveröff.) Sollte die entwicklungsphysiologische Analyse das Ergebnis bringen, daß bei *snaky* und Mo-Stamm tatsächlich dieselbe Funktion betroffen ist, dann wäre das eine weitere Parallele zu dem einzigen Modell, mit dem die genetischen Eigentümlichkeiten des Mo-Stammes verglichen werden können, nämlich mit den Plastiden.

Von den Plastiden wissen wir, daß Gene eine große Zahl von Änderungen in ihren Funktionen und ihrer Struktur verursachen können, aber nur im Sinne einer reversiblen Modifikation. Dazu gehören die zahllosen Fälle von *albina*-, *lutescens*-, *virescens*- usw. Formen. Diese reversible Modifikabilität einer Funktion oder Struktur durch ein Gen ist in *snaky* realisiert. Plastiden sind aber Strukturen eigener genetischer Kontinuität, und sie vermögen ihre spezifische Reaktionsweise unabhängig vom Kern weiterzugeben, wie die weniger zahlreichen Fälle nicht mendelnder Buntheit (*albomaculatio*) zeigen. Schließlich sind auch Fälle bekannt, in denen die Mutabilität der Plastiden durch ein Gen beeinflusst wird.

Am bekanntesten ist die *iojap*-Streifung beim Mais (RHOADES 1943, 1946). *ij ij*-Pflanzen sind grün-weiß-gestreift. $Ij Ij \text{♀} \times ij ij \text{♂}$ gibt eine rein grüne F_1 , in F_2 spalten wieder in monohybriden Zahlenverhältnissen *iojap*-Pflanzen heraus. Die reziproke Kreuzung $ij ij \text{♀} \times Ij Ij \text{♂}$ liefert dagegen in F_1 ein Gemisch von rein grünen, rein weißen und gestreiften Sämlingen in variablen Verhältnissen. Ob die F_1 -Pflanze grün, weiß oder gestreift ist, hängt davon ab, ob die Eizelle, aus der sie hervorging, nur grüne, nur weiße oder ein Gemisch von grünen und weißen Plastidenanlagen enthielt. Rückkreuzungen von gestreiften F_1 -Pflanzen mit $Ij Ij \text{♂}$ geben stets wieder das gleiche Bild. Kurz zusammengefaßt: *ij ij* induziert in den Plastiden eine irreversible Abänderung (Mutation) zu weiß. Die Plastiden bleiben auch dann weiß, wenn *ij* durch das dominante

¹ Herrn Prof. SONNEBORN danke ich für die freundliche Übersendung von *snaky*-Kulturen.

Allel *Ij* ersetzt wird. Ähnliche Verhältnisse wurden von ARNASON und WALKER (1949) bei Gerste und WOODS und DU-BUY (1951) bei *Nepeta* beschrieben. Gleichartige Angaben, allerdings weniger gut belegt, sind für Gerste noch von IMAI (1936) und Sô (1921) und für Reis von PAL (1941) gemacht worden.

Setzen wir nun „grün“ für funktionsfähige Struktur und „weiß“ für defekte so liegt die Parallele zwischen *iojap* und Mo-Stamm auf der Hand. Ein Klon vom Mo-Stamm (*ds ds*) entspricht einer gestreiften *iojap*-Pflanze. Wie verschieden die Mischungsverhältnisse zwischen „weiß“ und „grün“ in den einzelnen Zellen sind, geht aus Abb. 4 und 5 (Expansionsversuch) hervor. Das Starttier E produziert in dem beobachteten Zeitraum „rein grünes Gewebe“, die anderen Starttiere sind Mischzellen mit verschieden hohem Anteil an „weiß“. Die F_1 von Paar 5 entspricht einer sehr stark gestreiften F_1 -Pflanze aus *ij ij* ♀ $\times$ *Ij Ij* ♂, die von Paar 6 einer „grünen“ Pflanze aus derselben Kreuzung. Entsprechend ist der Ausfall der F_2 bei beiden Paaren: die stark mit „weiß“ durchmischten Zellen von Paar 5 liefern einen hohen Überschuß an stark „gestreiften“ in F_2 , während die F_2 von Paar 6 exakt das monohybride Spaltungsverhältnis „grün“ zu „gestreift“ = 1 : 1 liefert. Zwanglos fügen sich auch die Ergebnisse der Selektionsversuche dem Vergleich an. Wäre die Klonvermehrung von Maispflanzen möglich und man würde versuchen, in einer F_2 -Familie auf konstant „rein grün“ zu selektionieren, so könnte eine solche Selektion nur bei *Ij Ij*- und *Ij ij*-Pflanzen erfolgreich sein. In *ij ij* würden immer wieder „weiße“ Teile auftreten. Genau das Ergebnis zeigen die Selektionsversuche an den 14 F_2 -Klonen des Paares 5.

Es ist gut, zum Schluß nochmals zusammenzufassen, welche Punkte der Hypothese in den präsentierten Fakten bewiesen wurden. Über jeden Zweifel erhaben ist der monohybride Unterschied *Ds*—*ds* und die Existenz von Systemen eigener genetischer Kontinuität im Mo-Plasma. Prädetermination wurde ausgeschlossen (s. S. 411). Linie 6 aus Kreuzung 2, die auf Grund des Selektionsversuches als *Ds Ds* angesehen wird, ergibt nach Kreuzung mit „normal“ ein nicht mendelndes Verhältnis von Mo-Klonen:Normal-Klonen. Wie steht es aber mit den Beziehungen zwischen den induzierenden Genen *Ds* und *ds* und der plasmatischen Struktur? Es gibt natürlich noch andere Denkmöglichkeiten als die vorgetragene Auffassung über die mutative Wirkung von *ds* auf ein vorhandenes selbstvermehrungsfähiges System. Eine solche andere Annahme wäre etwa die, daß *ds* im Plasma neu einen Zustand schafft, der, einmal geschaffen, erhalten bleibt, und zwar auch dann, wenn *ds* wieder durch *Ds* ersetzt ist. Dieser neu geschaffene Zustand müßte sich im Sinne einer Hemmung auf ein anderes System, nämlich eines, das mit der Zelltrennung zu tun hat, auswirken. Formal-genetisch läßt sich das nicht entscheiden. Bisher ist kein solches Modell bekannt. Wir ziehen die Interpretation vor, die an einem gut durchanalysierten Modell — dem *iojap*-Fall — schon realisiert ist. — Es geht auch nicht gut, die Wirkung von *ds* nur in einer Förderung schon vorhandener defekter Strukturen zu sehen. Für die Vermehrung der Struktur wäre es belanglos, ob *ds* oder *Ds* vorhanden ist, und die Resultate der Kreuzungen und Selektionsversuche stünden schlecht im Einklang mit einer solchen Interpretation. Denn, läßt sich die Anzahl der Strukturen durch inäquale Verteilung schon so verändern, daß man von ihrem Vorhandensein lange nichts mehr merkt, dann wäre es doch

verwunderlich, wenn sie in über 450 Zellgenerationen nicht öfters endgültig herausverdünnt würde. Derselbe Einwand gilt auch gegen die Annahme, daß das Mo-verursachende Agens äußeren Ursprungs ist und die Wirkung des Gens *ds* eine fördernde für den Symbionten oder Parasiten wäre. Verschiedene Male wurde versucht, mit einem Brei (das sind aufgebrochene Tiere) aus starken Mo-Kulturen zu „infizieren“. Es traten zwar zweimal Monstra in den „infizierten“ Kulturen aus dem Normal-Stamm auf, die aber nach der 1. Autogamie starben.

Genetische Änderungen plasmatischer Systeme vermochte man bisher nur spontan festzustellen oder durch Anwendung blockierender Gifte mit fast 100%igem Erfolg zu erzwingen (z. B. die Wirkung von Acriflavin bei Hefen, EPHRUSSI 1951). Röntgenbestrahlung von Plastiden in Eizellen von *Antirrhinum* brachten keine erhöhte Häufigkeit nicht mendelnder Buntheit gegenüber den unbehandelten Kontrollen (MALY unveröff.). Lediglich Gene, und zwar rezessive, sind, wie die zitierten Fälle bei den Pflanzen zeigen, erfolgreich. Der hier geschilderte Fall bringt einen weiteren Beitrag in diesem Sinne.

Es sei erlaubt, auf der Grundlage der wenigen Befunde eine allgemeine Vorstellung über die Mutabilität plasmatischer Systeme zu skizzieren. Gemeinsam ist allen plasmatischen Systemen, daß sie ebenso wie der Kern nur im Zusammenhang innerhalb der Zelle vermehrungsfähig sind. Abänderungen plasmatischer Systeme beobachten wir nur im Sinne eines Funktionsausfalles. Nehmen wir an, daß z. B. vom Kern zu den Plastiden Stoffe oder irgendwelche Vorstufen diffundieren, die in den Plastiden in einen Kreisprozeß eingebaut werden. Solch ein Kreisprozeß, einmal in Gang gesetzt, läuft von selbst weiter, aber beim Wachstum bzw. bei der Vermehrung der Plastiden werden neue Vorstufen derselben Art gebraucht. Sind davon aber zu wenig im Plasma vorhanden, so erhält nur ein Teil die nötige Vorstufe, ein kleiner Teil der Plastiden geht leer aus. Sinngemäß gilt dasselbe für ein eventuelles Überangebot eines Stoffes, das sich dann in einer Hemmung oder „Vergiftung“ auswirkt. Die Masse ist zwar gewachsen, aber ein Prozeß ausgefallen: die Plastide ist in einem Teil defekt geworden. Die Rolle der rezessiven Gene bestünde nicht notwendigerweise darin, eine spezifische genetische Struktur in der Plastide oder dem Plasmaelement zu verändern, sondern nur einen sich selbst erhaltenden Kreisprozeß durch Unter- oder Überangebot einer Vorstufe ausfallen zu lassen. Sinngemäß gilt das Gleiche für die spontane Mutabilität.

Summary

In *Paramecium aurelia* var. 4 stock 51 a monster producing strain arose. Single isolated animals from the Mo-strain produce normals and monsters in variable proportions. Animals are called monsters when they behave in the growth of the cell and nuclear fission quite normally but fail to separate. Chains and clumps are formed (Fig. 1—3) as a consequence of an inhibition of the separation (= constriction) mechanism. The amount of Mo-formation is scored in two ways: a) as the fraction of Mo-producing cultures which arose by isolation of single animals into a slide depression; b) as the strength of Mo-formation within a Mo-producing culture. The scoring system used in this paper is described in Table 1.

The behaviour of the Mo-strain was investigated during vegetative multiplication, in breeding and selection experiments. The results may briefly be summarized as follows.

1. The unequal distribution of the Mo-forming capacity during vegetative fissions is demonstrated in the expansion experiments (Fig. 4 and 5). The difference between the progeny of animal E in contrast to the others is only a quantitative one. There exists a significant correlation between percentage Mo-cultures in a progeny and the strength of Mo-formation within a Mo-culture (Fig. 6).

2. The Mo-strain shows slower fission rates than the normal strain, but only as the consequence and not as the cause of Mo-formation. A Mo-free culture from a Mo-strain has approximately the same fission rates as normal strains from stock 51 (Table 2).

3. The expression of the Mo-character is dependent on external conditions and autogamy. It is a general rule that in cultures from exautogamous isolations the Mo-expression is considerable lower than in cultures from the next reisolation (Fig. 7).

4. Breeding experiments have shown that the ability of Mo-formation is dependent on a recessive gene (ds/ds) and a cytoplasmic component. The results from the different crosses are presented in Table 3 and 4 and graphically demonstrated in Fig. 8. The progenies of exconjugants could be grouped according to their similarity in behaviour in F_1 and F_2 . This is shown in Fig. 9.

5. The cytoplasmic component of the Mo-strain is transmissible during conjugation to the normal mate, independent of *kappa* transfer.

6. The results of the breeding experiments as well as the behaviour of the Mo-strain during vegetative reproduction are interpreted by a hypothesis which is closely parallel to that for the well known *iojap*-variegation in maize (RHOADES): The Mo-strain has a recessive gene ds/ds which induces an irreversible defect in a cytoplasmic system, which has his own genetic continuity. Once the change (mutation) has taken place, it will be propagated irrespective of the presence or absence of the inducing gene ds . The self reproducing cytoplasmic system or structure is assumed to be present in high numbers in each cell, and to be connected in its function with a constriction mechanism at cell separation.

7. The amount of Mo-production can be influenced by selection. Extensive selection experiments are reported and some data presented in Table 5 and 6. In 14 clones from one F_2 progeny (pair nr. 5) which contained significantly more Mo-producing clones than could be expected on a segregational basis, a selection experiment was performed in order to get rid of the Mo-forming ability. Half of the selected clones could produce monsters again, the other half lost the Mo-forming ability irreversibly. Those which didn't lose the Mo-forming capacity are regarded to have the inducing gene ds/ds , while from the other half of lines the capacity to form the defective cytoplasmic structures was irreversibly lost through sorting out during selection.

8. Predetermination is excluded by the fact that in all 14 F_2 clones in absence of selection to normal the Mo-character persisted through 300 cell generations and could be brought to high expression at any time by selection.

9. The results are discussed in relation to a comparable trait observed by STOCKING in *Paramecium caudatum*. The striking similarity to the *iojap* variegation is pointed out. The hypothesis put forward in this paper is the most probable one and its bearing on the problem of the mutability of cytoplasmic systems is discussed.

Herr Prof. SONNEBORN gab mir im Winter 1953/54 Gelegenheit, in seinem Laboratorium die Technik der *Paramecium*-Genetik zu erlernen. Die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. ermöglichte mir die Reise nach den USA, Herrn Prof. MELCHERS danke ich für die freizügige Förderung dieser Arbeiten, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung. Herr FREIBERG fertigte die Zeichnungen an, und gewissenhafte Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeiten leisteten im Laufe der Zeit Frau G. BORCHARDT-DROSTE, Frau E. LONČARIĆ-MUČINIĆ, Fräulein I. SAUER-BREY und Fräulein M. SCHOLZ. Allen sei herzlichst gedankt.

Literatur

ARNASON, T. J., and G. W. R. WALKER: An irreversible gene induced plastid mutation. *Canad. J. Res.*, C **27**, 172 (1949). — CHATTON, E., et M. CHATTON: L'influence des facteurs bactériens sur la nutrition, la multiplication et la sexualité des Infusoires. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **176**, 1262 (1923). — EPHRUSSI, B., and H. HOTTINGUER: On an instable cell state in yeast. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**, 75 (1951). — IMAI, Y.: Recurrent auto- and exomutation of plastids resulting in tricolored variegation in *Hordeum vulgare*. *Genetics* **21**, 752 (1936). — KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, 2. Aufl. 1943. — PAL, B. P.: A new type of variegation in rice. *Indian J. Agric. Sci.* **11**, 170 (1941). — RHOADES, M. M.: Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **29**, 327 (1943). — Plastid mutations. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **11**, 202 (1946). — SÔ, M.: On the inheritance of variegation of barley. *Jap. J. Genetics* **1**, 21 (1921). — SONNEBORN, T. M.: Experimental production of chains and its genetic consequences in the ciliate protozoan, *Colpidium campylum* (Stokes). *Biol. Bull.* **63**, 187 (1932). — Recent advances in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*. *Advanc. Genet.* **1**, 264 (1947). — Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. exp. Zool.* **113**, 87 (1950). — STOCKING, R. J.: Variation and inheritance in abnormalities occurring after conjugation in *Paramecium caudatum*. *J. exp. Zool.* **19**, 387 (1915). — WICHTERMANN, R.: The biology of *Paramecium*. New York u. Toronto 1953. — WOODS, M. W., and H. G. DuBUY: Hereditary and pathogenic nature of mutant mitochondria in *Nepeta*. *J. nat. Cancer Inst.* **11**, 1105 (1951).

Dr. ROLAND MALY, Max-Planck-Institut für Biologie,
Abt. MELCHERS, Tübingen a. N., Corrensstr. 41

Aus dem Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien

MODELLVERSUCHE ZUR SELEKTIONSWIRKUNG
VERSCHIEDENER CHROMOSOMALER STRUKTURTYPEN
VON *DROSOPHILA SUBOBSCURA* COLL.

Von

DIETHER SPERLICH

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 17. März 1958)

An strukturell polymorphen Arten wurden bereits zahlreiche populationsgenetische Untersuchungen durchgeführt. Besonders an amerikanischen *Drosophila*-Arten konnten wertvolle Ergebnisse erzielt werden. Unter diesen sind die Arten *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* und *D. robusta* gut untersucht. Unter den europäischen Arten erwies sich *D. subobscura* als für populationsgenetische Untersuchungen geeignet. In natürlichen Populationen dieser Art finden sich für alle fünf langen Chromosomen mehrere verschiedene Strukturtypen, die sich voneinander durch einfache Inversionen oder Inversionskomplexe unterscheiden (KUNZE-MÜHL und SPERLICH 1955). Wie vergleichende Untersuchungen zeigten, kommen sehr viele dieser Strukturtypen in großen Teilen des Verbreitungsgebietes der Art vor, während nur wenige auf kleinere Gebiete beschränkt zu sein scheinen (STUMM-ZOLLINGER 1953, RICHTER und HÜNDLER 1955, GOLDSCHMIDT 1956). Obwohl umfassende Untersuchungen über den prozentuellen Anteil, den die einzelnen Strukturtypen am Aufbau der lokalen Populationen nehmen, noch fehlen, läßt sich schon sagen, daß die geographische Verteilung der verschiedenen Strukturtypen wenig unterschiedlich ist. Viele, relativ häufige Strukturtypen scheinen im gesamten Verbreitungsgebiet vorzukommen und nur ganz wenige endemisch zu sein. Auch für deutliche Häufigkeitsunterschiede an verschiedenen Standorten liegen noch keine Beweise vor. Vielmehr dürften wenigstens die häufigen Strukturtypen ziemlich gleichmäßig im Verbreitungsgebiet verteilt sein. Untersuchungen über jahreszeitliche Häufigkeitsschwankungen der Strukturtypen verliefen fast negativ (STUMM-ZOLLINGER 1953, KUNZE-MÜHL, MÜLLER und SPERLICH 1958).

Für alle bis jetzt gut untersuchten strukturell polymorphen *Drosophila*-Arten konnte der Nachweis erbracht werden, daß ein positiver Heterosiseffekt den strukturellen Polymorphismus aufrechterhält. Die Arten erreichen ein den gegebenen Umweltfaktoren entsprechendes adaptives Häufigkeitsgleichgewicht der verschiedenen Strukturtypen, das sich bei Fortschreiten in vertikaler und horizontaler Richtung mit den Änderungen der Umwelt verschiebt. Auch jahreszeitliche Häufigkeitsschwankungen werden im Sinne eines solchen adaptiven Gleichgewichts interpretiert (s. Zusammenfassung bei MAINX 1956). Besonders überzeugende Ergebnisse konnten an künstlichen Populationen gewonnen werden. Im Konkurrenzversuch zeigt es sich, daß bei bestimmten Temperaturen, verschiedener Luftfeuchtigkeit und anderen kontrollierbaren Umweltfaktoren ein

bestimmtes Häufigkeitsgleichgewicht der verwendeten Strukturtypen erreicht wird.

Solche Selektionsversuche mit Stämmen von *D. subobscura* durchzuführen, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Es soll der Beweis erbracht werden, daß auch bei *D. subobscura* derselbe Mechanismus, der bei den anderen Arten das Häufigkeitsgleichgewicht bestimmt, vorliegt. Aus der geographischen und jahreszeitlichen Verteilung der Strukturtypen konnte bisher bei *D. subobscura* kein Anhaltspunkt dafür gewonnen werden. Für die Untersuchungen wurden Stämme verwendet, die in mehr als einem Chromosom strukturell polymorph waren. Dadurch war es möglich, auch die Frage des Zusammenwirkens mehrerer heterozygoter Zustände zu untersuchen. Bei allen bisherigen Selektionsversuchen wurde nur der strukturelle Polymorphismus in einem Chromosom untersucht.

Als besonders geeignet erwiesen sich die schon von WRIGHT und DOBZHANSKY (1946) in ihren Versuchen mit *D. pseudoobscura* verwendeten Populationskästen nach TEISSIER. Kästen ähnlicher Bauweise wurden angefertigt.

Durch 15 Löcher im Boden des Kastens können Gläser mit Nährboden eingeführt und, wenn der Nährboden verbraucht ist, durch neue ersetzt werden. Es wurde der übliche Standardnährboden für *Drosophila* verwendet. Begonnen wurde mit vier Gläsern, jeden dritten Tag wurde ein neues hinzugefügt, so lange bis alle 15 Löcher mit Nährbodengläsern besetzt waren. Sodann wurde das erste Glas nach weiteren drei Tagen durch ein neues ersetzt usw.; dadurch blieb jedes Glas durchschnittlich 45 Tage im Kasten. Die Entwicklungsdauer von der Eiablage bis zum Schlüpfen der Imagines dauerte bei einer Temperatur von 19,5° C, die im Kulturraum konstant gehalten wurde, durchschnittlich 22 Tage. Die Gläser, die entfernt wurden, enthielten zum großen Teil leere Puppenhüllen, der Nährboden war fast vollständig verbraucht.

Die Population erreichte bei einer Ausgangsbeschildung des Kastens mit etwa 500 Fliegen sehr bald eine bestimmte Größe, die durch die Futtermenge begrenzt war. Die Zahl der Fliegen betrug bei Erreichen der maximalen Populationsgröße ungefähr 3000—5000 je Kasten. Diese Populationsgröße wird schon in der ersten Generation nach der Beschickung erreicht. Sie genügt, um größere Zufallschwankungen auszuschalten.

Für die Versuche Kästen I—V wurden zwei Stämme verwendet, die in drei von den fünf langen Chromosomen strukturell voneinander verschieden sind. Der eine der beiden Stämme ist der aus einem Wildfang in der Schweiz gewonnene Stamm „Küsnacht“ (ZOLLINGER 1950), der strukturell homozygot ist und als Standardanordnung dem Entwurf der Chromosomenkarte (MAINX, KOSKE und SMITAL 1953) und allen bisherigen Arbeiten mit *D. subobscura* zugrunde liegt. Der zweite Stamm „Biganzolo“ wurde in Oberitalien isoliert. Er enthält folgende Strukturtypen: A_{St} , I_1 , U_{St} , U_{1+2} , E_{St} , E_{1+2} , E_8 und O_{St} . Die Bezeichnung der Strukturtypen erfolgt nach der von KUNZE-MÜHL und SPERLICH (1955) durchgeführten Weise. Der Stamm „Biganzolo“ enthält also in allen Chromosomen, außer dem I-Chromosom, die Standardanordnung. Für die Chromosomen E und U liegen außerdem weitere Strukturtypen in Gestalt von E_{1+2} , E_8 und U_{1+2} vor, während das I-Chromosom nur durch den Strukturtyp I_1 vertreten ist. Der Strukturtyp I_1 ist von I_{St} durch eine kleine Inversion, die sich von 22 A/B bis 25 A/B erstreckt, unterschieden. Die Lage des Bulbus, der in der Inversion eingeschlossen ist, gestattet es, die homozygoten Zustände I_{St}/I_{St} und I_1/I_1 leicht zu unterscheiden. Zur Feststellung der relativen Häufigkeit der Strukturtypen im Ausgangsmaterial wurden 250 Larven aus der

Tabelle 1

Strukturtyp	A _{St}	I ₁	U _{St}	U ₁₊₂	E _{St}	E ₁₊₂	E ₈	O _{St}
Häufigkeit	100 %	100 %	18 ± 2,4 %	82 ± 2,4 %	13 ± 2,1 %	83 ± 2,4 %	4 ± 1,2 %	100 %

Nachkommenschaft der Kreuzung Küsnacht × Biganzolo untersucht. Die gefundene Frequenz der verschiedenen Strukturtypen im Stamm Biganzolo zeigt Tabelle 1.

Bei der Wahl der beiden Stämme waren folgende Überlegungen maßgebend. Die Inversionstypen I₁, U₁₊₂ und E₈ sind weitverbreitete Strukturtypen, die auch homozygot vorliegen können, ohne die Lebensfähigkeit ihrer Träger merkbar zu beeinträchtigen (KUNZE-MÜHL und SPERLICH 1955). Das in natürlichen Populationen inversionsreichste Chromosom O liegt bei beiden Stämmen im Standardtyp vor. Dadurch war zu erwarten, daß die Konkurrenzverhältnisse der Strukturtypen in den anderen Autosomen klarer zum Ausdruck kommen. Beide Stämme sind stark ingezüchtet und durch lange Zeit im Laboratorium gehalten, so daß sie in sich genisch weitgehend homogen sein dürften. Ursprünglich waren sie allerdings von geographisch verschiedenen Standorten abgeleitet. DOBZHANSKY (1948a, b, 1950) hat gefunden, daß bei Verwendung von verschiedenen Strukturtypen des III. Chromosoms von *D. pseudoobscura* gleicher geographischer Herkunft fast immer ein Heterosisgleichgewicht erreicht wird, während Strukturtypen verschiedener geographischer Herkunft oft keinen deutlichen positiven Heterosiseffekt ergeben.

Die ersten vier Versuchsreihen dienen der vorläufigen Beantwortung der Frage, inwieweit und wann sich ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Strukturtypen einstellt, wenn man sie in verschiedenem Anteil in den Versuch eingeführt hat. Die Beschickung der Kästen erfolgte folgendermaßen:

	Stamm Küsnacht	Stamm Biganzolo
Kasten 1	80% ♀♀ + ♂♂	20% ♀♀ + ♂♂
Kasten 2	20% ♀♀ + ♂♂	80% ♀♀ + ♂♂
Kasten 3	50% virginelle ♀♀	50% ♂♂
Kasten 4	50% ♂♂	50% virginelle ♀♀

Die Gesamtzahl der je Kasten verwendeten Fliegen war 500. In Kasten 3 und 4 war der prozentuelle Anteil der Fliegen vom Stamm Küsnacht und Stamm Biganzolo gleich. Sie unterschieden sich voneinander dadurch, daß in Kasten 3 die Fliegen aus dem Stamm Küsnacht unbefruchtete ♀♀ waren, während die ♂♂ dem Stamm Biganzolo entstammten; der Kasten 4 wurde reziprok angesetzt. Dadurch sollte eine allfällige Einwirkung der strukturell gleichartigen X-Chromosomen verschiedener Herkunft oder des Plasmas der beiden Stämme auf die Einstellung des Gleichgewichts geprüft werden.

Für den Beginn des Versuches ergibt sich, unter Berücksichtigung der Tabelle 1 für die Zusammensetzung des Stammes Biganzolo, die folgende Aufstellung über die Häufigkeit, mit der die verschiedenen Strukturtypen der verschiedenen Chromosomen eingebracht wurden (Tabelle 2).

Die Versuche wurden Mitte Dezember begonnen, ungefähr 6 Wochen nach der Beschickung der Kästen wurde die erste Stichprobe entnommen. Hierzu werden an drei aufeinanderfolgenden Tagen frische Nährbodengläser in jeden Kasten gebracht. Nach je 24Std werden die mit Eiern

belegten Gläser wieder entnommen. Die schlüpfenden Larven werden mit Hefe gemästet und knapp vor der Verpuppung präpariert. Die Ernährungs- und Temperaturverhältnisse sind optimal für das Heranwachsen der Larven. Mitte März und Ende Mai wurden weitere Stichproben entnommen und untersucht.

Die ermittelte Häufigkeit der strukturell Heterozygoten unter den Larven zeigt Tabelle 3. Im A- und O-Chromosom war nur je ein Strukturtyp vorhanden, daher traten dort keine Inversionen auf. Die Chromosomen I, U und E waren durch je zwei bzw. drei Strukturtypen vertreten. Die strukturell heterozygoten Zustände dieser Chromosomen wurden an den entsprechenden Inversionschlingen erkannt. Eine Unterscheidung

der strukturell homozygoten Zustände nach der Bandscheibenfolge ist bei *D. subobscura* recht schwierig. Daher wurde die Erfassung der strukturell homozygoten Zustände erst in Versuch Kasten 5, 6 und 7

und auch dort nur für das I-Chromosom durchgeführt. Die mögliche Kombination E_8/E_{1+2} wurde, da sie bei der Untersuchung sehr selten auftrat, nicht berücksichtigt. In den senkrechten Kolonnen der Tabelle 3 findet sich die prozentuelle Häufigkeit der einzelnen Strukturheterozygoten. Die erwartete Häufigkeit der Strukturheterozygoten ergibt sich nach der Hardy-Weinberg-Formel aus dem Anteil der Strukturtypen bei der Beschickung der Kästen (s. Tabelle 2).

Der Vergleich zwischen den erwarteten und den gefundenen Heterozygotenfrequenzen in Kasten 1 und 2 zeigt deutlich ein Ansteigen der Heterozygotenfrequenz während der Versuchsdauer. Dieses Ansteigen scheint sehr rasch zu erfolgen, da schon in der ersten Stichprobe, d. h. nach sechs Wochen, der Unterschied hervortritt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stichproben sind im einzelnen nicht beweisend. Vergleicht man aber mittels des χ^2 -Tests die Häufigkeit der Ausgangspopulation mit der durchschnittlichen Häufigkeit in den Stichproben, so ergibt sich sowohl für Kasten 1 als auch für Kasten 2 ein signifikanter Unterschied. (Die Häufigkeitsangaben für E_{St}/E_{1+2} und E_{St}/E_8 wurden im Test zusammengezogen. Die Fehlerbelastung der erwarteten Werte ist so klein, daß sie vernachlässigt werden kann.)

In Kasten 3 und 4, in die die häufigen Strukturtypen in ungefähr gleichen Anteilen eingeführt waren, ist deren Heterozygotenfrequenz von etwa 50% gleichgeblieben. Eine Prüfung mit χ^2 gibt in beiden Kästen keine Sicherung für ein Ansteigen der Heterozygotenfrequenz. Lediglich der heterozygote Zustand E_{St}/E_8 scheint im Versuch häufiger aufzutreten als erwartet. Zwischen den Ergebnissen der beiden Kästen zeigt sich kein Unterschied; eine spezifische Wirkung des Plasmas oder des X-Chromosoms der beiden Stämme ist für diesen Fall nicht anzunehmen. Auch in Kasten 1 und 2 zeigt sich das rapide Ansteigen der Heterozygotenfrequenz für E_8 . Es erhebt sich die Frage, warum die Heterozygoten für E_8 im Stamm Biganzolo selbst bei den gewöhnlichen Kulturbedingungen nur in einem so geringen Prozentsatz vertreten sind. Man kann annehmen, daß die verschärfte Konkurrenz im Populationskasten, wahrscheinlicher aber die Änderungen

Tabelle 2. Häufigkeit der Strukturtypen

	I _{St} %	I ₁ %	U _{St} %	U ₁₊₂ %	E _{St} %	E ₁₊₂ %	E ₈ %
Kasten 1	80	20	84	16	83	16	1
Kasten 2	20	80	34	66	31	66	3
Kasten 3	50	50	59	41	56,5	41,5	2
Kasten 4	50	50	59	41	56,5	41,5	2

des Gengefüges durch die Kreuzung mit dem Stamm Küsnacht, die Ursache für das starke Ansteigen der Heterozygotenfrequenz für E_8 darstellt.

Im allgemeinen geht aus den Versuchen hervor, daß unter den verschärften Konkurrenzverhältnissen im Populationskasten ein rasches Ansteigen der Heterozygotenfrequenz auf etwa 50% erfolgt und dieses Gleichgewicht dann erhalten

Tabelle 3

		Zahl der Larven	Häufigkeit der Heterozygoten			
			I_{St}/I_1 %	U_{St}/U_{1+2} %	E_{St}/E_{1+2} %	E_{St}/E_8 %
Kasten 1	Erwartete Häufigkeit	—	32	27	26	2
$\chi^2 = 21,9238$ $p = 0,001$	3. 2. 50	30	50	33	33	30
	20. 3. 50	30	56	33	40	20
	29. 5. 50	20	50	55	30	10
	Durchschnittliche Häufigkeit in den Stichproben	80	51	39	25	21
Kasten 2	Erwartete Häufigkeit	—	32	45	40	2
$\chi^2 = 16,9760$ $p = 0,001$	3. 2. 50	30	43	47	50	27
	20. 3. 50	30	47	47	43	17
	29. 5. 50	30	40	50	47	13
	Durchschnittliche Häufigkeit in den Stichproben	90	43	48	47	20
Kasten 3	Erwartete Häufigkeit	—	50	48	47	2
$\chi^2 = 1,7975$ $p = 0,5 \text{ bis } 0,3$	10. 2. 50	30	47	53	30	13
	13. 3. 50	30	66	47	30	7
	Durchschnittliche Häufigkeit in den Stichproben	60	57	50	30	10
Kasten 4	Erwartete Häufigkeit	—	50	48	47	2
$\chi^2 = 3,2662$ $p = 0,2 \text{ bis } 1,0$	10. 2. 50	30	63	57	30	30
	13. 3. 50	30	27	47	37	27
	8. 6. 50	16	25	56	43	6
	Durchschnittliche Häufigkeit in den Stichproben	76	41	55	35	23

bleibt. Dies gilt nicht nur für die Chromosomen I und U, sondern auch für E, wenn man bedenkt, daß hier drei verschiedene Strukturtypen am Aufbau der Population beteiligt sind. Ein Überschreiten der Heterozygotenfrequenz von 50% ist nirgends gesichert. Ein solches Gleichgewicht kann sich nur herstellen, wenn die strukturell Homozygoten den Heterozygoten selektiv unterlegen, die beiden homozygoten Kombinationen aber nicht sehr stark in der selektiven Bewährung unterschieden sind. Jede andere Beziehung der Selektionswerte würde zu einer anderen Relation zwischen Homo- und Heterozygoten führen (WRIGHT u. DOBZHANSKY 1946).

Durch den nächsten Versuch (Kasten 5) sollten einerseits die bisherigen Ergebnisse überprüft, andererseits sollten Anhaltspunkte über die Art der Selektionswirkung ermittelt werden. Auf Grund der in den ersten Versuchen gemachten Erfahrungen mußte die Häufigkeit der einzelnen Strukturtypen bei der Beschickung des Kastens so gewählt werden, daß der Anstieg der Heterozygotenhäufigkeit langsamer erfolgt. Die Stichprobenuntersuchungen wurden auch in kürzeren Zeitabständen durchgeführt. An den Versuchsmethoden wurde sonst nichts

Tabelle 4

Strukturtyp	A _{St}	I ₁	U _{St}	U ₁₊₂	E _{St}	E ₁₊₂	E ₈	O _{St}
Häufigkeit	100 %	100 %	50 ± 5,0 %	50 ± 5,0 %	52 ± 5,0 %	38 ± 4,0 %	10 ± 3,0 %	100 %

Wesentliches geändert. Die verwendeten Stämme waren dieselben wie in den vorhergehenden Versuchen. Der Stamm Biganzolo war inzwischen in Massenkultur gehalten worden und mußte daher vor der Verwendung noch einmal auf seine Zusammensetzung hin überprüft werden. Es ergab sich jetzt für den Stamm Biganzolo eine Häufigkeit der einzelnen Strukturtypen, wie sie Tabelle 4 zeigt.

Tabelle 5

Strukturtyp	I _{St}	I ₁	U _{St}	U ₁₊₂	E _{St}	E ₁₊₂	E ₈
Häufigkeit	85 %	15 %	92,5 %	7,5 %	93 %	5,5 %	1,5 %

Diese Verteilung entspricht wohl dem normalen Gleichgewicht im Stamm Biganzolo, das im Ausgangsmaterial für die ersten Versuchsreihen (Tabelle 1) durch die Art der Haltung der Kulturen auf rein statistischem Weg gestört ge-

Tabelle 6

Kasten 5	Zahl der untersuchten Larven	Häufigkeit der Heterozygoten			
		I _{St} /I ₁ %	U _{St} /U ₁₊₂ %	E _{St} /E ₁₊₂ %	E _{St} /E ₈ %
Erwartete Häufigkeit	—	26	14	10	3
3. 3. 52	114	7,0	8,8	6,1	0
4. 4. 52	129	35,6	28,6	24,8	0,8
8. 5. 52	125	44,8	34,4	27,2	0,8
7. 6. 52	174	47,7	47,1	30,4	1,7
17. 7. 53	152	49,3	45,5	46,1	9,2

wesen sein dürfte. Der Kasten 5 wurde mit 85 % vom Stamm Küsnacht und 15 % vom Stamm Biganzolo, mit einer Gesamtzahl von 600 Fliegen beschickt. Für die Ausgangszusammensetzung von Kasten 5 ergibt sich also Tabelle 5.

Der Versuch wurde am 30. 1. 52 begonnen. Anfang März, April, Mai und Juni 1952 und Mitte Juli 1953 wurden dem Kasten Proben entnommen und die prozentuelle Häufigkeit der Strukturheterozygoten festgestellt. Die Larven für die Präparation im März, April und Mai wurden in je 4 Gläsern unter optimalen Bedingungen aufgezogen und so die Selektion unter den Larven möglichst ausgeschaltet. Für die Untersuchung im Juni 1952 wurden aus dem

Kasten sechs Gläser entnommen und für die Präparation verwendet. Bei der Auswertung zu diesem Zeitpunkt schien die Population des Kastens ein gewisses Gleichgewicht in bezug auf die Strukturtypenhäufigkeit erreicht zu haben, und es wurde daher in der Präparation eine Pause von einem Jahr eingeschaltet. Die letzte Präparation erfolgte im Juli 1953, dabei wurden dem Kasten 360 Fliegen entnommen und zu je 20 in ein Kulturglas gebracht. Nachdem die Fliegen abgelegt hatten, wurden sie entfernt und die schlüpfenden Larven reichlich gemästet.

Es zeigt sich wieder ein deutliches Ansteigen der Heterozygotenhäufigkeit (Tabelle 6). Prüft man die Versuchsergebnisse in jedem Chromosom auf Heterogenität mit der χ^2 -Methode, so ergeben sich folgende Werte: I-Chromosom, $\chi^2 = 56,3433$; U-Chromosom, $\chi^2 = 47,7436$; E-Chromosom, $\chi^2 = 25,8676$. Bei drei

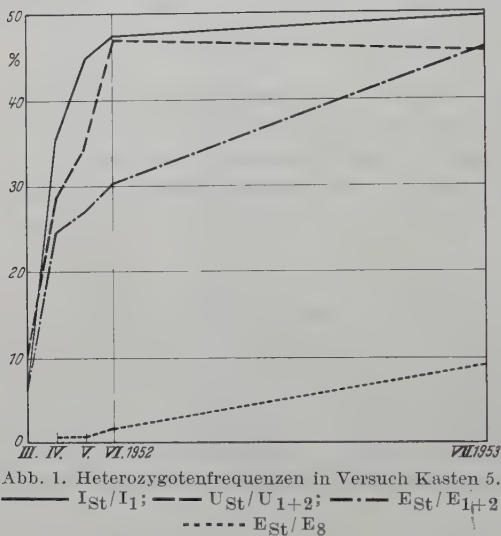


Abb. 1. Heterozygotenfrequenzen in Versuch Kasten 5.
 — I_{St}/I_1 ; - - U_{St}/U_{1+2} ; - · - E_{St}/E_{1+2}
 · · · E_{St}/E_8

E_{St}/E_{1-2} zu dieser Zeit erst eine Häufigkeit von 30% zeigen. Im Juli 1952 ist deren Häufigkeit aber auch auf 46% gestiegen. Die Häufigkeit der E_{St}/E_8 -Tiere scheint sehr langsam, aber stetig zu steigen. Ob die Häufigkeit 9,2%, die im Juli 1953 erreicht war, schon das erreichte Gleichgewicht darstellt oder ob ihre Häufigkeit noch weiter ansteigen würde, wurde nicht geprüft. Die graphische Darstellung (Abb. 1) zeigt den Verlauf der Änderung in der Heterozygotenfrequenz mit der Zeit. Sehr deutlich nähert sich die Kurve für die hohen Heterozygotenfrequenzen asymptotisch einer bestimmten Gleichgewichtslage.

Untersuchung der Strukturverhältnisse bei den Imagines

Die bisher angewandte Methode erlaubt es nur, Aussagen über die Strukturverhältnisse bei den Larven verschiedener Generationen zu machen. Da die Selektion während der Entwicklung der zur Untersuchung kommenden Larven nach Möglichkeit ausgeschaltet wurde, wurden in den bisherigen Versuchen nur die Häufigkeitsverschiebungen zwischen den verschiedenen Generationen erfaßt. Selektionsvorgänge innerhalb einer Generation müßten sich in einer Störung der relativen Häufigkeit zwischen den Heterozygoten und den beiden Homozygotentypen zeigen, wie sie in der Formel nach HARDY-WEINBERG zum Ausdruck

kommt. Um dies zu ermitteln, ist es notwendig, auch die strukturell homozygoten Anordnungen zu kennen. Dies ist am besten an den Anordnungen des I-Chromosoms durchführbar. Es wurden daher zunächst 52 Präparate der Probe vom Juli 1953 aus Kasten 5 dieser Untersuchung unterzogen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 7.

Es ergibt sich, daß die Verteilung der Strukturtypen-Kombinationen unter den Larven sehr gut der Verteilung nach HARDY-WEINBERG entspricht, Selektionsvorgänge innerhalb der Larvenentwicklung also nicht anzunehmen sind.

Um die Verteilung bei den Imagines zu ermitteln, wurden dem Kasten 5 in der Zeit vom 16.—22. 7. 1953 vierundsechzig Männchen entnommen. Jedes dieser Männchen wurde mit unbefruchteten Weibchen des Stammes Küsnacht gekreuzt und von der Nachkommen-schaft je sechs Larven präpariert. Da der Stamm Küsnacht strukturell

homozygot ist, konnte aus dem strukturellen Aufbau der Nachkommen ein Rückschluß auf den der verwendeten Männchen des Kastens 5 gezogen werden. Die Zahl von sechs untersuchten Larven genügt, um keinen allzu großen Fehler zu machen. Ein solcher entsteht, wenn nach der Kreuzung $St/St \times Inv/St$ unter sechs Präparaten zufällig kein heterozygoter Zustand auftritt, obwohl er in der

Tabelle 7

	I_1/I_1	I_1/I_{St}	I_{St}/I_{St}
Zahl der Präparate	8	24	20
d. s. %	15,4	46,1	38,5
Erwartete Verteilung nach der Hardy-Weinberg-Formel in % ($2I_1 = 0,385$)	14,8	47,4	37,8

Tabelle 8

	Verteilung unter den Fliegen			Strukturtypenhäufigkeit	
	U_{St}/U_{St}	U_{St}/U_{1+2}	U_{1+2}/U_{1+2}	U_{St}	U_{1+2}
Häufigkeit in Prozent	37,2	55,8	7,0	65,1	34,9
	I_{St}/I_{St}	I_{St}/I_1	I_1/I_1	I_{St}	I_1
Häufigkeit in Prozent	41,8	53,5	4,7	68,6	31,4
	E_{St}/E_{St}	E_{St}/E_{1+2}	E_{1+2}/E_{1+2}	E_{St}	E_{1+2}
Häufigkeit in Prozent	57,5	37,5	5,0	76,3	23,7 ¹

¹ Die Inversion E_{St}/E_8 trat nur in 2 Präparaten auf. Sie wurde aus Gründen der Übersicht weggelassen, so daß für das E-Chromosom $n = 41$ bzw. 82 ist.

Hälfte aller Präparate zu erwarten wäre. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei einer solchen Kreuzung sechs St/St -Larven zur Beobachtung gelangen, ist $(1/2)^6 = 1/64$. Es ist also anzunehmen, daß nur in einem von 64 Fällen ein St/Inv -Tier als homozygot beurteilt wurde. Dasselbe gilt auch für ein St/Inv -Tier, welches als Inv/Inv beurteilt wird, wenn zufällig in allen sechs Präparaten der heterozygote Zustand Inv/St vorhanden ist.

Von den angesetzten 64 Einpärchenkulturen konnten nur 43 ausgewertet werden. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle 8.

Es fällt auf, daß die Häufigkeit der heterozygoten Zustände I_{St}/I_1 und U_{St}/U_{1+2} wie bei den Larven bei etwa 50% liegt, während die von E_{St}/E_{1+2} nur 37,5% erreicht. Bei den strukturell Homozygoten überwiegen aber bei weitem die St/St -Tiere, während die Inv/Inv -Tiere nur in sehr geringem Prozentsatz auftreten. In der Tabelle 9 sind die gefundenen und die nach HARDY-WEINBERG errechneten Werte einander gegenübergestellt. Der Vergleich wurde nur für die Chromosomen I und U durchgeführt, da für das E-Chromosom, das durch drei verschiedene Strukturtypen vertreten ist, durch die geringe Häufigkeit von E_8 eine zu große Ungenauigkeit in der Berechnung entstehen würde.

Tabelle 9

	U_{St}/U_{St}	U_{St}/U_{1+2}	$\frac{U_{1+2}}{U_{1+2}}$	I_{St}/I_{St}	I_{St}/I_1	I_1/I_1
Gefundene Anzahl der Tiere	16	24	3	18	23	2
Erwartete Anzahl der Tiere	18,2	19,5	5,3	20,2	18,5	4,3
Differenz	-2,2	+4,5	-2,3	-2,2	+4,5	-2,3

Es zeigt sich, daß die gefundene Anzahl der Heterozygoten in beiden Chromosomen zu hoch ist, die homozygoten Zustände aber seltener auftreten, als es der Erwartung entspricht. Da die Zahlen klein sind, wurden für die Berechnung von χ^2 die Werte der Tabelle 9 so zusammengefaßt, daß alle homozygoten Zustände den heterozygoten gegenübergestellt wurden. Es ergeben sich folgende Werte:

	Ge- funden	Er- wartet	χ^2
Anzahl der Heterozygoten	47	38,0	2,1316
Anzahl der Homozygoten	39	48,0	<u>1,6875</u> 3,8191

Bei einem Freiheitsgrad entspricht das gefundene χ^2 einem p von 0,05; die Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung erscheint somit nur ganz schwach gesichert.

Die interchromosomalen Kombinationsmöglichkeiten

Im vorhergehenden wurde die Frequenz der verschiedenen Zustände für jedes Chromosom unabhängig von den anderen betrachtet. Es war nun von Interesse, das Beobachtungsmaterial auch hinsichtlich der Kombinationsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen homo- bzw. heterozygoten Zuständen der verschiedenen Chromosomen durchzusehen.

Die erste Frage, die hierbei untersucht wurde, war: Gibt es bestimmte Kombinationen zwischen Zuständen verschiedener Chromosomen, die bevorzugt miteinander vorkommen? Für die Beantwortung dieser Frage konnte das gesamte Untersuchungsmaterial verwendet werden. Es waren in den Versuchen Kasten 1, 2, 3, 4 und 5 dieselben Stämme und somit dieselben Strukturtypen verwendet worden. Somit bestanden in allen Versuchen gleiche interchromosomale Kombinationsmöglichkeiten. Da drei Chromosomen, nämlich I, U und E, untersucht

und die homozygoten Zustände nicht weiter unterschieden wurden, ergaben sich acht Kombinationsmöglichkeiten:

$I_{\text{hom}}U_{\text{hom}}E_{\text{hom}}$	$I_{\text{het}}U_{\text{het}}E_{\text{hom}}$
$I_{\text{het}}U_{\text{hom}}E_{\text{hom}}$	$I_{\text{het}}U_{\text{hom}}E_{\text{het}}$
$I_{\text{hom}}U_{\text{het}}E_{\text{hom}}$	$I_{\text{hom}}U_{\text{het}}E_{\text{het}}$
$I_{\text{hom}}U_{\text{hom}}E_{\text{het}}$	$I_{\text{het}}U_{\text{het}}E_{\text{het}}$

Für das E-Chromosom liegen insofern komplizierte Verhältnisse vor, als dort drei verschiedene heterozygote Zustände möglich sind. Für die vorliegende Untersuchung wurden die beiden Strukturtypen E_{1+2} und E_8 nicht unterschieden und die homozygoten Zustände $E_{\text{St}}E_{\text{St}}$, E_{1+2}/E_{1+2} und E_8/E_8 wurden unter E_{hom} gerechnet, ebenso der heterozygote Zustand E_{1+2}/E_8 . Nur die heterozygoten Zustände E_{St}/E_{1+2} und E_{St}/E_8 wurden auch als solche gewertet.

Tabelle 10

In Tabelle 10 ist die erwartete Anzahl der einzelnen Kombinationsmöglichkeiten der gefundenen gegenübergestellt. Die erwartete Prozenzhäufigkeit für die verschiedenen interchromosomalen Kombinationen ergibt sich aus

Kombination	Erwartet	Gefunden	D	χ^2
$I_{\text{hom}}U_{\text{hom}}E_{\text{hom}}$	253,2	270	+ 16,8	1,1147
$I_{\text{het}}U_{\text{hom}}E_{\text{hom}}$	140,4	134	- 6,4	0,2917
$I_{\text{hom}}U_{\text{het}}E_{\text{hom}}$	123,2	119	- 4,2	0,1432
$I_{\text{hom}}U_{\text{hom}}E_{\text{het}}$	121,4	108	- 13,4	1,4791
$I_{\text{het}}U_{\text{het}}E_{\text{hom}}$	96,9	110	+ 13,1	1,7710
$I_{\text{het}}U_{\text{hom}}E_{\text{het}}$	96,5	103	+ 6,5	0,4378
$I_{\text{hom}}U_{\text{het}}E_{\text{het}}$	91,2	88	- 3,2	0,1123
$I_{\text{het}}U_{\text{het}}E_{\text{het}}$	77,2	68	- 9,2	1,0964
Summe	1000,0	1000		6,4462

dem Produkt der Einzelhäufigkeiten der daran beteiligten homo- und heterozygoten Chromosomen. Unter Berücksichtigung der in jedem Versuch vorliegenden Gesamtzahl der Präparate konnte auf die erwartete Anzahl der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten geschlossen werden. Die erwarteten Werte der Tabelle 10 wurden durch Summierung der erwarteten Werte der Einzeluntersuchungen ermittelt.

Die gefundenen Werte konnten aus dem Rohprotokoll entnommen werden. Es sei darauf hingewiesen, daß hier die Verhältnisse einer Larvenpopulation erfaßt wurden. Man kann annehmen, daß unter den abgelegten Eiern die Kombinationen in ihrer Häufigkeit der Erwartung entsprachen. Eine Verschiebung könnte sich nur dann zeigen, wenn bereits während der Entwicklung vom Ei bis zur verpuppungsreifen Larve Selektionskräfte wirksam sind. Da jedoch die zur Untersuchung bestimmten Larven unter möglichst guten Bedingungen gehalten wurden, ist anzunehmen, daß die Selektionswirkung sehr gering und somit auch nur eine unbedeutende Verschiebung zu erwarten ist. Andererseits ist die Gesamtzahl der untersuchten Larven relativ groß, so daß auch eine geringfügige Verschiebung bereits nachweisbar werden könnte.

Aus dem Vergleich der erwarteten mit den gefundenen Werten geht hervor, daß die Abweichung zwischen den Werten überall innerhalb der statistischen Erwartung liegt ($p=0,50$). Besonders sei auf die Kombinationsmöglichkeiten zwischen je zwei heterozygoten mit einem homozygoten Zustand hingewiesen ($I_{\text{het}}U_{\text{het}}E_{\text{hom}}$, $I_{\text{het}}U_{\text{hom}}E_{\text{het}}$ und $I_{\text{hom}}U_{\text{het}}E_{\text{het}}$). Für diese Kombinationsklassen ergibt sich das Zusammenwirken zweier heterozygoter, also selektiv bevorzugter Zustände. Die Anzahl der heterozygoten Zustände ist für jede dieser drei Kombinationen gleich. Würden zwei heterozygote Zustände miteinander eine besonders günstige Kombination ergeben, müßte sich das hier zeigen. Tatsächlich

aber existiert eine solche bevorzugte Kombination nicht. Noch deutlicher müßte eine additive Wirkung des Selektionsvorteils bei der Klasse mit drei heterozygoten Zuständen werden. Doch auch dafür ergibt sich keine positive Abweichung. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß es sich in allen Versuchen um Larvengenerationen handelt, die unter sehr günstigen Bedingungen gehalten wurden.

Um die interchromosomalen Beziehungen im Selektionsgeschehen im Verlauf mehrerer Generationen verfolgen zu können, wurde ein weiterer Versuch begonnen. Es standen zwei Stämme zur Verfügung, die beide das I-Chromosom in Form des Strukturtyps I_1 aufwiesen; voneinander unterschieden sie sich in den Strukturtypen des E-, O- und U-Chromosoms. Der eine Stamm „Luob 5/33234“ enthielt im E- und O-Chromosom die Standardstrukturtypen und im U-Chromosom die Strukturtypen U_{1+2} bzw. U_{1+2+6} , der andere Stamm „Cambridge 8/47412“ die Strukturtypen E_{St} , E_{1+2} , O_{3+4} und U_1 . Im A-Chromosom enthielten beide Stämme die Standardstruktur. In Luob 5/33234 lag das U-Chromosom in zwei verschiedenen Strukturtypen U_{1+2} und U_{1+2+6} vor, die beide die gleiche Häufigkeit hatten. Ebenso waren im Stamm Cambridge 8/47412 die Strukturtypen E_{St} und E_{1+2} gleich häufig. Die Stämme sind verschiedener geographischer Herkunft, der Stamm Luob 5/33234 war von einem Wildfang in den österreichischen nördlichen Kalkvorpalen (Lunz, Obersee), der Stamm Cambridge 8/47412 von einem Wildstamm aus Cambridge in England abgeleitet worden. Beide Stämme sind hochgradig ingezüchtet. Unter Verwendung des Stammes Küsnacht, der in allen Chromosomen die Standardanordnung besitzt, wurden zwei Populationskästen (Kasten 6 und 7) folgendermaßen beschickt:

	Luob 5/33234	Cambr. 8/47413	Küsnacht
Kasten 6	105 = (15%)	—	595 (= 85%)
Kasten 7	—	75 = (15%)	425 (= 85%)

Unter Berücksichtigung der Strukturtypenhäufigkeit in den einzelnen Stämmen ergibt sich Tabelle 11 für die Häufigkeitsverteilung in Kasten 6 und 7.

Tabelle 11

	A _{St}	E _{St}	E ₁₊₂	I _{St}	I ₁	O _{St}	O ₃₊₄	U _{St}	U ₁₊₂	U ₁₊₂₊₆	U ₁
Kasten 6	100%	100%	—	85%	15%	100%	—	85%	7,5%	7,5%	—
Kasten 7	100%	92,5%	7,5%	85%	15%	85%	15%	85%	—	—	15%

Da für das I-Chromosom in beiden Kästen die gleichen Verhältnisse vorliegen, ist zu erwarten, daß bei gleichen Versuchsbedingungen die Häufigkeitszunahme des Strukturtyps I_1 gleich rasch erfolgt und das erreichte Häufigkeitsgleichgewicht gleich hoch ist. Ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung im I-Chromosom wäre nur dann zu erwarten, wenn durch die Unterschiede in den anderen Chromosomen die Häufigkeitsverteilung im I-Chromosom verschieden beeinflußt wird. Es sind nämlich im Kasten 6 nur im I- und U-Chromosom, im Kasten 7 aber im I-, E-, O- und U-Chromosom heterozygote Zustände zu erwarten. An interchromosomalen Kombinationen sind im Kasten 6 nur vier verschiedene Möglichkeiten zu erwarten, während im Kasten 7 sechzehn verschiedene Möglichkeiten gegeben sind. Da die positive Selektionswirkung von den Heterozygoten ausgeht, im Kasten 6 aber nur zwei, im Kasten 7 aber vier

verschiedene heterozygote Zustände vorhanden sind, so ist dadurch ein verschiedenes Verhalten in beiden Kästen denkbar.

Die beiden Kästen wurden unter den bereits früher angegebenen Bedingungen gehalten. In drei aufeinanderfolgenden Monaten wurden je sechs frisch belegte Gläser dem Kasten entnommen und für die Präparation der Larven vorbereitet. Es wurden je Glas etwa 20 Larven präpariert, d. h., je Stichprobe standen etwa 20 Speicheldrüsenpräparate zur Verfügung. Für die Chromosomen A, E, O und U wurden die strukturell heterozygoten Zustände unterschieden, während für das I-Chromosom auch die homozygoten Zustände analysiert wurden.

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt Tabelle 12. Wieder findet sich in beiden Kästen ein starker Anstieg der Heterozygotenfrequenz bis etwa 50%. Für das

Tabelle 12

Kasten 6	n	I_{St}/I_{St} %	I_1/I_{St} %	I_1/I_1 %	$\frac{U_{1+2}/U_{St}}{U_{1+2+6}/U_{St}}$ %	U_{St}/U_1 %	O_{St}/O_{3+4} %	E_{St}/E_{1+2} %
Ausgangs- population 26. 11.	—	72,2	25,5	2,3	25,5	—	—	—
20. 1.	128	47,7	41,4	10,9	39,8	—	—	—
20. 2.	114	35,1	57,0	7,9	52,6	—	—	—
10. 4.	121	40,5	51,2	8,9	43,8	—	—	—
Kasten 7 Ausgangs- population 30. 11.	—	72,2	25,5	2,3	—	25,5	25,5	13,9
20. 1.	133	46,6	45,1	8,3	—	25,6	26,3	23,3
20. 2.	118	39,8	44,1	16,1	—	35,6	50,8	36,4
10. 4.	109	26,6	59,6	13,8	—	52,3	53,2	39,5

I-Chromosom, das auch in den homozygoten Zuständen unterschieden werden konnte, zeigt sich allerdings, daß die homozygoten Zustände I_{St}/I_{St} und I_1/I_1 nicht gleich häufig sind, obwohl der heterozygote Zustand I_1/I_{St} eine Häufigkeit von etwa 50% erreicht hat. Es scheinen die Tiere mit I_{St}/I_{St} besser vital zu sein als die mit I_1/I_1 . Daß die Heterozygoten I_{St}/I_1 trotzdem eine Häufigkeit von 50% erreichen, wie dies nur zu erwarten wäre, wenn die Häufigkeit von I_{St} und I_1 gleich ist, kann durch die folgenden Annahmen erklärt werden. Einerseits bewirkt der positive Heterosiseffekt eine selektive Bevorzugung des Zustandes I_1/I_{St} , so daß bereits bei der Larvenpopulation eine kleine Verschiebung der Häufigkeitsverteilung zugunsten der Heterozygoten zu erwarten ist, andererseits ergibt sich als Konsequenz der Hardy-Weinberg-Verteilung, daß erst bei starken Häufigkeitsunterschieden zwischen I_1 und I_{St} eine Abweichung der Heterozygotenhäufigkeit von 50% größer als der Versuchsfehler wird. Vergleicht man die Häufigkeitsverteilung im I-Chromosom beider Kästen miteinander, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung. Noch deutlicher wird es, wenn die Häufigkeit des Strukturtyps I_{St} ermittelt und die Werte der beiden Kästen einander gegenübergestellt werden (Tabelle 13).

Auch hier fehlt also eine interchromosomale Wechselwirkung bei der Einstellung des Gleichgewichts zwischen den Strukturtypen.

Tabelle 13. Häufigkeit von I_{St} in Prozenten (n = 218 bzw. 256)

	Kasten 6 %	Kasten 7 %
Ausgangs- population	85,0	85,0
20. 1.	68,4	69,2
20. 2.	63,4	61,9
10. 4.	66,1	56,4

Diskussion der Ergebnisse

Der erste Teil dieser Untersuchungen wurde durchgeführt, um den positiven Heterosiseffekt der verschiedenen chromosomalen Strukturtypen, wie er bereits in ähnlichen Versuchen für *D. pseudoobscura* (WRIGHT und DOBZHANSKY 1946; DOBZHANSKY 1947, 1949), für *D. persimilis* (SPIESS 1950, 1957) und für *D. robusta* (LEVITAN 1951) nachgewiesen wurde, auch für *D. subobscura* zu beweisen. Dabei zeigte sich, daß trotz Verwendung von Stämmen verschiedener geographischer Herkunft in allen Fällen eine Annäherung an ein bestimmtes Häufigkeitsgleichgewicht der Strukturtypen erreicht wird. Bei *D. pseudoobscura* wird in vielen Fällen nur dann ein Heterosigleichgewicht beobachtet, wenn die verwendeten Strukturtypen von gleichen Standorten abgeleitet waren; Strukturtypen verschiedener geographischer Herkunft geben meist keinen deutlichen positiven Heterosiseffekt (DOBZHANSKY 1948a, b, 1950).

Die weiteren Untersuchungen (Kasten 6—7) befaßten sich mit dem Zusammenwirken der verschiedenen heterozygoten Zustände in den verschiedenen Chromosomen. Eine besonders günstige oder ungünstige Kombination unter den verschiedenen heterozygoten Inversionen konnte nicht festgestellt werden, so daß ein spezifisches Zusammenwirken zweier oder mehrerer Inversionen verschiedener Chromosomen nicht anzunehmen ist.

Es erhebt sich nun die Frage, ob Tiere mit mehr als einem heterozygoten Zustand mehr bevorzugt sind als solche mit nur einem. Da jeder heterozygote Zustand jedes Chromosoms einen positiven Heterosiseffekt hervorruft, ist anzunehmen, daß die Selektionsvorteile, die von den einzelnen heterozygoten Zuständen ausgehen, im Sinne einer Verstärkung des Heterosiseffektes zusammenwirken. Zur Klärung dieser Frage können die Ergebnisse von Kasten 6 und 7 herangezogen werden (Tabelle 12 und 13). In beiden Kästen war der Strukturtyp I_1 und I_{St} mit gleicher Häufigkeit in den Anfangspopulationen vorhanden, in den anderen Chromosomen unterschieden sich die beiden Populationen voneinander. In Kasten 6 lag nur das U-Chromosom, in Kasten 7 U-, O- und E-Chromosom in mehr als einem Strukturtyp vor. Wäre nun der selektive Vorteil, der aus einem einzigen heterozygoten Zustand eines Chromosoms erwächst, gleich dem, der durch das Zusammenwirken von 2, 3 oder 4 heterozygoten Zuständen entsteht, so müßten die Ergebnisse von Kasten 6 und 7 für das I-Chromosom wesentlich voneinander abweichen. Es wäre dann zu erwarten, daß der Selektionsvorteil des heterozygoten Zustandes im I-Chromosom aufgehoben ist, wenn in einem der anderen Chromosomen bereits ein heterozygoter Zustand vorliegt. Nun ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein heterozygoter Zustand des I-Chromosoms mit einem heterozygoten eines anderen Chromosoms zusammentrifft, in Kasten 6 viel geringer als in Kasten 7. Aus diesem Grunde wäre bei der Annahme, daß die Wirkung eines heterozygoten Zustandes bereits den maximal möglichen Selektionsvorteil erreicht, in Kasten 7 ein wesentlich langsames Absinken der Häufigkeit des Strukturtyps I_{St} zu erwarten als in Kasten 6. Eine einfache Überlegung zeigt, daß schon bei der Zusammensetzung der Anfangspopulation in Kasten 6 nur ein Viertel aller homozygoten Zustände des I-Chromosoms durch einen anderen heterozygoten Zustand geschützt wäre, während dies in Kasten 7 in mehr als der Hälfte aller Fälle gegeben ist. Es müßte daher für das I-Chromosom die Häufigkeitsverschiebung in Kasten 6 doppelt so rasch erfolgen wie in Kasten 7.

Die Frequenzen von I_1 sind aber in allen Untersuchungen für Kasten 6 und 7 gleich. Daher muß angenommen werden, daß die einzelnen strukturell heterozygoten Zustände der Chromosomen zusammenwirken, und zwar so, daß die Reihung nach der Anzahl der heterozygoten Zustände (0, 1, 2, 3, 4) auch der Reihung nach der selektiven Bewährung entspricht.

Daß bei dem Vergleich der erwarteten und der gefundenen Häufigkeit von Larven mit mehr als einem heterozygoten Zustand (Tabelle 10) kein Unterschied im Sinne einer Bevorzugung der Klassen mit 2 und 3 heterozygoten Strukturtypen gefunden werden konnte, liegt wohl daran, daß es sich um eine optimal ernährte Larvengeneration handelt und die Selektionswirkungen wahrscheinlich in der Metamorphose zur Imago eintreten. Darauf weisen schon die Ergebnisse der Tabellen 7 und 9 hin, wo sich für die chromosomale Zusammensetzung der Larven eine gute Übereinstimmung mit der Hardy-Weinberg-Verteilung ergibt (Tabelle 7), für die der Imagines aber eine schwache Abweichung festzustellen ist (Tabelle 9).

Zusammenfassung

1. Künstliche Populationen von *D. subobscura* von bekannter chromosomal-struktureller Zusammensetzung wurden im Populationskasten mehrere Generationen hindurch einem erhöhten Selektionsdruck ausgesetzt. Durch cytologische Untersuchung der folgenden Generationen konnte festgestellt werden, daß von den strukturell heterozygoten Zuständen positive Selektionswirkungen ausgehen.

2. In einer Population mit einer anfänglich niedrigen Heterozygotenhäufigkeit erfolgt ein allmähliches Ansteigen der Heterozygotenfrequenz. Diese nähert sich asymptotisch einem bestimmten Häufigkeitsgleichgewicht.

3. Während bei einer untersuchten Larvengeneration in der Verteilung der strukturell homo- und heterozygoten Zustände keine Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung festgestellt werden konnte, zeigt eine Untersuchung der Imagines eine schwache Abweichung im Sinne der Verschiebung zugunsten der Strukturheterozygoten.

4. Eine Begünstigung bestimmter interchromosomaler Kombinationen von Strukturheterozygoten konnte innerhalb der Larvenpopulation nicht festgestellt werden.

5. Im Konkurrenzversuch verlaufen die Selektionsvorgänge im untersuchten I-Chromosom unabhängig von der Strukturtypenverteilung in den anderen Chromosomen. Dies kann nur so gedeutet werden, daß die heterozygoten Zustände in den einzelnen Chromosomen im Sinne einer Steigerung des positiven Heterosis-effektes zusammenwirken.

Herrn Prof. F. MAINX möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine vielen Ratschläge herzlichst danken.

Literatur

DOBZHANSKY, TH.: Genetics of natural populations. XIV. A response of certain gene arrangements in the third chromosome of *Drosophila pseudoobscura* to natural selection. Genetics **22**, 142—160 (1947). — Genetic of natural populations. XVIII. Experiments on chromosomes of *Drosophila pseudoobscura* from different geographic regions. Genetics **33**, 588—602 (1948a). — Genetic structure of natural populations. Yearb. Carn. Inst. **47**, 193—203 (1948b). — Observations and experiments on natural selection in *Drosophila*. Proc. VIII. Int. Congr. Genetics 1949. Hereditas (Lund) Suppl. 210—224 (1949). — Genetics of natural

populations. XIX. Origin of heterosis through natural selection in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **33**, 288—302 (1950). — GOLDSCHMIDT, E.: Chromosomal polymorphism in a population of *Drosophila subobscura* from Israel. *J. Genet.* **54**, 474—496 (1956). — KUNZE-MÜHL, E., u. D. SPERLICH: Inversionen und chromosomale Strukturtypen bei *Drosophila subobscura* COLL. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 65—84 (1955). — KUNZE-MÜHL, E., E. MÜLLER u. D. SPERLICH: Qualitative, quantitative und jahreszeitliche Untersuchungen über den chromosomalen Polymorphismus natürlicher Populationen von *Drosophila subobscura* COLL. in der Umgebung von Wien. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* (im Druck). — LEVITAN, M.: Experiments on chromosomal variability in *Drosophila robusta*. *Genetics* **36**, 285—305 (1951). — MAINX, F.: Der chromosomale Strukturpolymorphismus natürlicher Populationen als Problem der Genetik und der Evolution. *Novant'anni delle leggi Mendeliane*, 425—453, Rom 1956. — MAINX, F., TH. KOSKE u. E. SMITAL: Untersuchungen über die chromosomale Struktur europäischer Vertreter der *Drosophila obscura*-Gruppe. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 351—372 (1953). — RICHTER, H., u. M. HÜNDLER: Die geographische Verbreitung der chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* COLL. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 85—92 (1955). — SPIESS, E.: Experimental populations of *Drosophila persimilis* from an altitudinal transect of the Sierra Nevada. *Evolution* **4**, 14—33 (1950). — Relation between frequency and adaptive value of chromosomal arrangements in *Drosophila persimilis*. *Evolution* **11**, 84—93 (1957). — STUMM-ZOLLINGER, E.: Vergleichende Untersuchung über die Inversionshäufigkeit bei *Drosophila subobscura* in Populationen der Schweiz und Südwesteuropas. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 382—407 (1953). — WRIGHT, S., and TH. DOBZHANSKY: Genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **31**, 125—156 (1946). — ZOLLINGER, E.: Ein strukturell homozygoter Stamm von *Drosophila subobscura* aus einer Wildpopulation. *Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* **25**, 33—35 (1950).

Dr. DIETHER SPERLICH, Institut für Allgemeine Biologie, Wien IX.,
Schwarzspanierstr. 17

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig

ZUR VERERBUNG DER MONÖZIE BEIM HANF*

Von

DIETHARD KÖHLER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. März 1958)

Die Art *Cannabis sativa* ist diözisch-dimorph, enthält also Weibchen und Männchen, die sich auch in der Wuchsform unterscheiden. Nicht selten, rassenweise verschieden, treten Subdiözisten auf: 1. Subandrözisten, die sich von Männchen ableiten; sie besitzen den Habitus der Männchen, doch ist ein Teil der männlichen Blüten durch intersexe oder weibliche Blüten ersetzt. 2. Subgynözisten, die die Wuchsform von Weibchen haben; bei ihnen treten anstelle eines Teils der weiblichen Blüten männliche oder intersexe Blüten. Die Selbstungsnachkommen der Subgynözisten haben den Habitus der Weibchen und besitzen nur weibliche oder weibliche und männliche Blüten (McPHEE 1925, HIRATA 1928, BORTHWICK u. SCULLY 1954). Subgynözisten sind also in bezug auf die Habitusfaktoren homozygot, woraus geschlossen werden darf, daß dies auch für die Weibchen gilt. Durch planmäßige Inzucht von Subgynözisten und Auslese der Pflanzen mit dem höchsten Anteil männlicher Blüten entstanden einhäusige Sorten (HOFFMANN, 1941, NEUER u. v. SENGBUSCH, 1943). Sie bestehen vorwiegend aus Monözisten, die männliche und weibliche Blüten in etwa gleicher Zahl tragen und die Wuchsform der Weibchen besitzen. Monözie ist also eine genetisch bedingte Variation der Gynözie.

Echte Männchen sind in bezug auf Habitus und Geschlecht heterozygot. Kreuzt man sie mit den homozygoten Weibchen, so entstehen Männchen und Weibchen. Die Männchen einiger Rassen besitzen Heterochromosomen (HIRATA 1929, MACKEY 1939). Das Geschlecht der Männchen und Monözisten ist modifizierbar: Sehr kurzer Tag wirkt auf beide verweiblichend. Männchen werden dabei zu Subandrözisten (MAEKAWA 1929, SCHAFFNER 1931, PETIT 1952, HESLOP-HARRISON 1956), Monözisten zu Weibchen (HUHNKE u. a. 1952).

Über die Vererbungsweise der Habitus- und Geschlechtsmerkmale sind zwei Hypothesen aufgestellt worden. Nach v. SENGBUSCH (1952) hat das Männchen den Genotyp XY, wobei das Y-Chromosom sowohl den Habitus als auch das Geschlecht bestimmt. Weibchen und Monözisten haben zwei X-Chromosomen; die Monözisten verschieden stark männlicher Geschlechtsausprägung sollen zusätzlich „Monözierealisatoren“ besitzen, die als Allele eines Gens aufzufassen sind. Das Allel mit der stärksten weiblichen Valenz dominiert. Dagegen kam HOFFMANN (1947, 1952) auf Grund seiner züchterischen und cytologischen Ergebnisse zu der Auffassung, daß die Geschlechts- und Habitusmerkmale beim Hanf polygen bedingt sind. Die Faktoren sollen sowohl den Habitus als auch das

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. HARDER, meinem verehrten Lehrer, zum 70. Geburtstag gewidmet.

Geschlecht im diözischen und monözischen Hanf regulieren und in Autosomen und Geschlechtschromosomen liegen.

Wegen dieser unterschiedlichen Beurteilung der Geschlechtsformen des Hanfes wurde die nachstehend beschriebene Untersuchung durchgeführt.

Material und Methoden

Monözisches *Saatgut*, sowie Saatgut der diözischen Sorten „Pelozella“ und „Carmagnola“ stellte Herr Prof. Dr. v. SENGBUSCH freundlicherweise zur Verfügung. Als zweite monözische Sorte konnte „Bernburger Einhäusiger“ verwendet werden. Beide monözischen Sorten unterscheiden sich anscheinend nicht grundsätzlich.

Beleuchtung: In einer behelfsmäßigen Klimakammer, im Winter überdies auch im Gewächshaus, wurden die Pflanzen unter Leuchtstoffröhren Philips TL 40 und Osram HNW 200 im Langtag angezogen.

Zur *vegetativen Vermehrung* wurden von den Stammpflanzen die Sproßspitzen mit etwa 3 vollausgebildeten Blattpaaren abgeschnitten und die Schnittlinge einen Tag lang mit der Schnittfläche etwa 3 cm tief in eine wäßrige Lösung von 10^{-5} g/cm³ Naphthylessigsäure eingetaucht, danach ebensotief in Sand oder Erde gesteckt. Nach 2–3 wochenlangem Verweilen im gut beleuchteten Schwitzkasten hatten sie sich reichlich bewurzelt. Die an den Stammpflanzen unterhalb der Schnittfläche ausgetriebenen Seitensprosse wurden später ebenfalls abgeschnitten und bewurzelt. Auf diese Weise entstanden vegetative Geschwisterschaften mit bis zu 10 genetisch gleichen Individuen.

Bei *Kreuzungen* wurde zur Bestäubung mehrerer Weibchen nur ein Bestäuber zugelassen. Die Kreuzungsgruppen wurden räumlich isoliert. Nur zur Herstellung der F_1 (Monözisten $\times$ Männchen aus Carmagnola-Hanf) wurden wegen der großen Zahl der zu bestäubenden Pflanzen 16 Männchen verwendet. Die Auswahl der stark männlichen Monözisten, d. h. der Pflanzen, die einen besonders großen Anteil männlicher Blüten an der Gesamtblütenzahl besaßen, erfolgte nach dem Gesamteindruck der vegetativen Geschwisterschaft. — Die F_1 bestand aus Männchen und Weibchen. Nur unter besonders günstigen Bedingungen (hohe Lichtintensität, langer Tag, reichliche Stickstoffdüngung) bildeten einige Weibchen einzelne männliche Blüten aus, wurden also schwach männliche Monözisten. Da ihre wenigen männlichen Blüten aber nie zur Bestäubung mehrerer Pflanzen ausreichten, wurden von der F_1 als Kreuzungsväter nur die Männchen benutzt. Als Kreuzungsmütter aus der F_1 dienten nur Pflanzen ohne männliche Organe.

Modifikabilität der Habitus- und Geschlechtsmerkmale: Von 138 Pflanzen aus *diözischem* Saatgut erwiesen sich 66 Pflanzen und deren 77 Ableger nach Habitus und Geschlecht als Männchen, 72 Pflanzen und deren 112 Ableger als echte Weibchen. Alle Pflanzen aus *Monözistensaatgut* besaßen den Habitus der Weibchen aus diözischem Hanf. Hinsichtlich des Geschlechts unterschieden sich jedoch die Ableger einer Pflanze oft sehr stark. In einer vegetativen Geschwisterschaft konnten rein weibliche Pflanzen und stark männliche Pflanzen auftreten. Die darin zum Ausdruck kommende Modifikabilität der Geschlechts- (nicht Habitus-) merkmale beruht darauf, daß die Stecklinge nicht gleichzeitig geschnitten, während der Bewurzelung unterschiedlich geschädigt wurden usw. Wegen dieser starken Modifikabilität ist ein Vergleich der Geschlechtsausprägung im weiblichen Habitus bei verschiedenen Nachkommenschaften nur zulässig, wenn sie unter gleichen Bedingungen (gleichzeitig) gewachsen sind. Durch wiederholtes Umstellen der Pflanzen, gleichzeitige und gleichmäßige Düngung (vor allem mit KNO_3) und individuelles Begießen wurde außerdem versucht, möglichst einheitliche Bedingungen während der Anzucht zu gewährleisten.

Der *Monöziegrad* eines Individuums wurde folgendermaßen bestimmt. Jede blüten(sproß-)tragende Blattachse an der Hauptachse¹ erhält einen bestimmten Wert: $\frac{1}{4}$ bei einseitiger Ausbildung einer intersexen² Blüte, $\frac{1}{2}$ bei beidseitiger Ausbildung intersexer Blüten

¹ Diese Blüten(sprosse) gehören nur scheinbar zur Hauptachse, sie sind morphologisch dem Achselsproß zugeordnet.

² Bei intersexen Blüten haben die Glieder des einzigen Kreises teils Staubblatt-, teils Fruchtblattcharakter.

oder einseitiger Ausbildung einer männlichen Blüte, 1 bei beidseitiger Ausbildung männlicher Blüten, 0 wenn nur weibliche Blüten vorhanden sind. Alle Werte einer Pflanze werden addiert und ergeben ihren Monöziegrad¹. Die Gesamtblattzahl über der ersten Blüte variiert sehr wenig im Gegensatz zu der von der photoperiodischen Reaktion abhängigen präfloralen Blattzahl. Die Bewertung aller Achseln mit 2 und mehr männlichen Blüten als 1 ist deswegen berechtigt, da je Blattachsel um so mehr männliche Blüten gebildet werden, je größer die Zahl der Blattachseln mit männlichen Blüten insgesamt ist.

Zur *Auswertung* wurden die verschiedenen Kreuzungsnachkommenschaften einer Anzucht auf ihren Anteil an Monözisten eines bestimmten Monöziegrades verglichen. Da einerseits in bezug auf die Monözieallele homozygote Pflanzen als Weibchen, andererseits, wie oben für die F_1 erwähnt, heterozygote Pflanzen als Monözisten ausgeprägt sein können, durfte nicht erwartet werden, daß die Aufspaltung einer Nachkommenschaft in Weibchen und Monözisten Beziehungen zu den Mendelschen Spaltzahlen erkennen läßt. Dieser Fall dürfte nur ausnahmsweise realisiert werden. Es wurde daher folgendermaßen vorgegangen: Sämtliche Monözisten einer Nachkommenschaft(sgruppe) wurden nach ihren Monöziegraden geordnet. Dann wurden die Monözisten, vom höchsten Monöziegrad angefangen, gezählt. Bis zum Monöziegrad 8 wurden z. B. 4 Pflanzen, bis zum Grad 6 12 Pflanzen, bis zum Grad 4 24 Pflanzen gezählt. Diese Zahlen werden in Prozent der Gesamtzahl der Pflanzen mit weiblichem Habitus umgerechnet. Bei insgesamt 200 Pflanzen entsprechen die vorstehenden Zahlen 2, 6 und 12 „Summenprozent“. Es läßt sich so angeben, welchen Monöziegraden bestimmte Summenprozentätze entsprechen. Die Mendelzahlen einer F_2 bei dihybridem Erbgang $1/16$, $(1+6)/16$, $(1+6+9)/16$ entsprechen 6,25; 43,75; 100 Summenprozent, die einer Rückkreuzung mit dem rezessiven Elter $1/4$, $(1+2)/4$, $(1+2+1)/4$ entsprechen 25, 75, 100 Summenprozent. Liegen in einer F_2 6,25 bzw. 43,75 Summenprozent bei den gleichen Monöziegraden, auf die in der Rückkreuzung mit dem rezessiven Elter 25 bzw. 75 Summenprozent treffen, so ist dies ein Beweis für die Beteiligung zweier Gene an der Ausprägung der Monözie. Der Gesamtanteil der Pflanzen des weiblichen Habitus an Monözisten, unabhängig von deren Monöziegraden, wurde nur zur Prüfung der Homogenität zwischen den Nachkommenschaften herangezogen (χ^2 -Methode).

Ergebnisse

Sommeraussaat 1956: Angezogen wurden im Gewächshaus einzelpflanzenweise in 7 cm-Töpfen folgende Eltern und Kreuzungen:

C: Diözischer Carmagnola-Hanf

F_1 : Monözisten $\times$ Männchen aus Carmagnola-Hanf

F_2 : F_1 -Weibchen $\times$ F_1 -Männchen

R_{mon} : Rückkreuzung mit monözischem Elter: Monözisten $\times$ F_1 -Männchen

R_{di} : Rückkreuzung mit diözischem Elter: Weibchen aus Pelozella-Hanf $\times$ F_1 -Männchen.

Zur Herstellung der F_2 und beider Rückkreuzungen waren 2 F_1 -Männchen verwendet worden; sie sind in Tabelle 1 durch Indices 1 und 2 gekennzeichnet. Sämtliche Pflanzen, die zunächst nur Narben erkennen ließen, wurden in größere Töpfe ($\varnothing$ 10 cm) umgesetzt. Dies sollte ihnen die Ausbildung männlicher Blüten ermöglichen, falls sie wegen Nährstoffmangel daran gehindert waren (in Abb. 1 sind die anfänglichen Monözisten und die Summe anfänglicher Monözisten + die erst nach dem Umtopfen als Monözisten erkennbar gewordenen Pflanzen getrennt aufgezeichnet). Die Aufspaltung in Männchen mit männlichem Habitus und Weibchen + Monözisten, beide mit weiblichem Habitus, zeigt die Tabelle 1. Der Männchen-Anteil ist in allen Gruppen gleich; er liegt bei 42% und weicht gesichert von 50% ab. Da die Gruppen jedoch verschiedene Monözistenanteile

¹ Pflanzen, die nur an Nebenachsen männliche Blüten ausbilden, erhalten den Monöziegrad s.

haben, besteht also keine Beziehung zwischen dieser Abweichung und ihrem Monözistenanteil. Über den Monözistenanteil der Gruppen

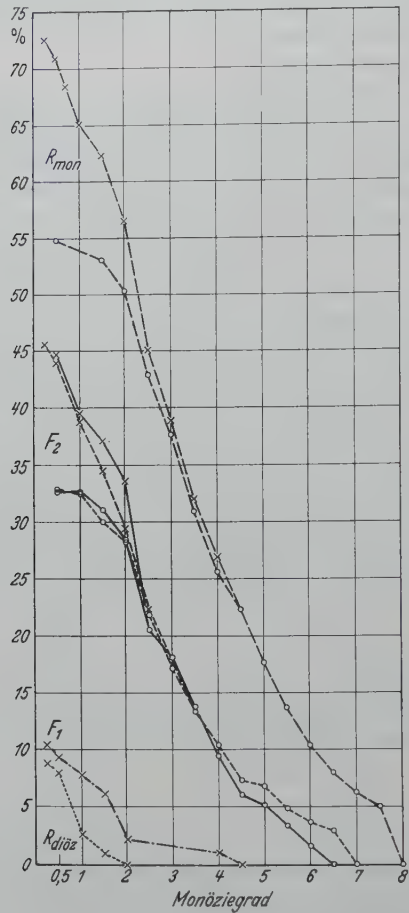


Abb. 1. Verteilung der Monözisten im Sommerversuch 1956. Abszisse: Monöziengrade; Ordinate: Summenprozent der Monözisten am weiblichen Habitus; $\times$ anfängliche und spätere Monözisten; — Rückkreuzung mit monözischem Elter; Rückkreuzung mit diözischem Elter; — $F_2(2a)$; - - - $F_2(1)$; — F_1

im weiblichen Habitus und die Monöziengrade ihrer Monözisten gibt die Abb. 1 Auskunft. Auf der Ordinate sind die Summenprozentsätze über der in Monöziengrade geteilten Abszisse angegeben (= Prozentsatz der Pflanzen mit weiblichem Habitus, die diesen oder einen höheren Monöziengrad haben). In F_1 und R_{di} traten einige schwach männliche Monözisten auf. In beiden sind keine in bezug auf die

Tabelle 1. Anzucht Sommer 1956

Gruppenbezeichnung	Kreuzung	Zahl der Nachkommenschaften	Zahl der Pflanzen Gesamt-n	Zahl der δ	Anteil δ am Gesamt-%	Homogenität in Gruppen für δ Anteil p	Homogenität zwischen Gruppen für δ Anteil im weiblichen Habitus p	Anteil δ am weiblichen Habitus %	Zahl der δ	Zahl der Pflanzen mit weiblichem Habitus
R_{mon}	$M \times (M \times C) \delta_{12}$	7 (6)	300	125	42	0,3—0,2	0,1—0,05	73	127	175
$F_2(1)$	$(M \times C) \varphi \times (M \times C) \delta_1$	5	192	76	40	0,9—0,8	0,3—0,2	77	101	132
$F_2(2a)$	$(M \times C) \varphi \times (M \times C) \delta_2$	10	634	268	42	0,7—0,5	0,5—0,3	45	52	116
R_{di}	$P \varphi \times (M \times C) \delta_2$	7	182	69	38	0,3—0,2	0,1—0,05	46	169	366
F_1	$M \times C \delta$	4	173	77	45	0,7—0,5	0,2—0,1	9	10	113
$F_{diöz.}$	$M \times C$	—	64	30	42	—	0,95—0,9	11	11	96
		—					—	6	2	34

Monözieallele homozygoten Pflanzen zu erwarten, wenn die Mütter der R_{di} und die Väter der F_1 keine Monözieallele enthielten. Da die Nachkommenschaften der R_{di} in bezug auf den Monözistenanteil homogen sind, die Monözisten also nicht bevorzugt in bestimmten Nachkommenschaften auftraten, scheinen ihre Mütter also nur Normalallele¹ besessen zu haben. Das Auftreten von Monözisten in der R_{di} besagt also, daß die Normalallele nicht absolut dominant über die Monözieallele sind. Mehr und stärker männliche Monözisten enthält die F_2 , am meisten die R_{mon} . Im folgenden werden nur die oberen Kurven, die die Summen anfängliche + spätere Monözisten darstellen, berücksichtigt. Den Monöziegrad 4,5 erreichen in F_2 etwa 6%, in R_{mon} etwa 22%, den Grad 0,5 in F_2 44%, in R_{mon} 70% der Pflanzen mit weiblichem Habitus. Bei einem dihybriden Erbgang sind in F_2 an doppelt-homozygoten Rezessiven 6,25% zu erwarten, in R_{mon} 25%; an doppelt + einfach homozygoten Rezessiven werden erwartet 43,75% in der F_2 und 75% in der R_{mon} . Auf ein weiteres Wertepaar: 25 Summenprozent in F_2 und 50% in R_{mon} treffen bei dihybridem Erbgang die Maxima der einfach-Homozygoten $(1 + 6/2)/16$ und $(1 + 2/2)/4$. Dieses Wertepaar gilt auch für das monohybride Schema ($F_2:1/4$, R_{mon} 2/4 homozygote Monözisten). Die gute Übereinstimmung mit den für ein dihybrides Erbschema geltenden Zahlen läßt den Schluß zu, daß für die

¹ Als Normalallel wird die Genform bezeichnet, die im normalen diözischen Hanf vorliegt.

Tabelle 2. a) Anzucht Sommer 1957

Gruppenbezeichnung	Kreuzung	Zahl der Nachkommenschaften	Zahl der Pflanzen Gesamt-n	Zahl der ♂	Anteil ♂ am Gesamt-%	Homogenität in Gruppen für ♂ Anteil p	Homogenität zwischen Gruppen für ♂ Anteil im weiblichen Habitus p	Zahl der Pflanzen mit weiblichem Habitus	Zahl der ♀	Anteil ♀ am weiblichen Habitus %	Homogenität in Gruppen für ♀ Anteil im weiblichen Habitus p	Homogenität zwischen Gruppen für ♀ Anteil im weiblichen Habitus p
P_{mon}	M_{selbst}	2	87	—	—			87	75	86	0,5—0,3	0,01
R_{mon}	$(M \times C) \frac{\sigma}{\sigma} \times M$	5	147	—	—			147	57	39	0,8—0,9	
$F_2(3)$	$(M \times C) \frac{\sigma}{\sigma} \times (M \times C) \frac{\sigma}{\sigma}$	9	349	153	44	0,7—0,5	0,3—0,2	196	50	26	0,3—0,2	
$F_2(2b)$	$(M \times C) \frac{\sigma}{\sigma} \times (M \times C) \frac{\sigma}{\sigma}$	10	642	257	40	0,8—0,7		385	56	14	0,01	0,05—0,02
		(8)						295	52	18	0,2—0,1	

b) Anzucht Winter 1956/57

R_{di}	$P \frac{\sigma}{\sigma} \times (M \times C) \frac{\sigma}{\sigma}$	4	140	66	47	0,7—0,5		74	13	18	0,5—0,3	
$F_3(3b)$	$(M \times C) \frac{\sigma}{\sigma} \times (M \times C) \frac{\sigma}{\sigma}$	4	186	76	41	0,2—0,1	0,7—0,5	110	85	77	0,1—0,05	
F_1	$M \times C \frac{\sigma}{\sigma}$	(3)	38	16	42	0,5—0,3		86	71	82	0,3—0,2	
		5						22	4	18		

Ausprägung der Monözie zwei Gene verantwortlich sind. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde der folgende Versuch durchgeführt:

Sommersaatsaat 1957: Angezogen wurden ständig in 7 cm-Töpfen Selbstungsnachkommenschaften von Pflanzen, die sich im Sommer 1956 als am stärksten monözisch erwiesen hatten (P_{mon}), Rückkreuzungen mit monözischem Elter (reziprok zur R_{mon} der Aussaat 1956) und zwei F_2 -Gruppen. Eine von diesen

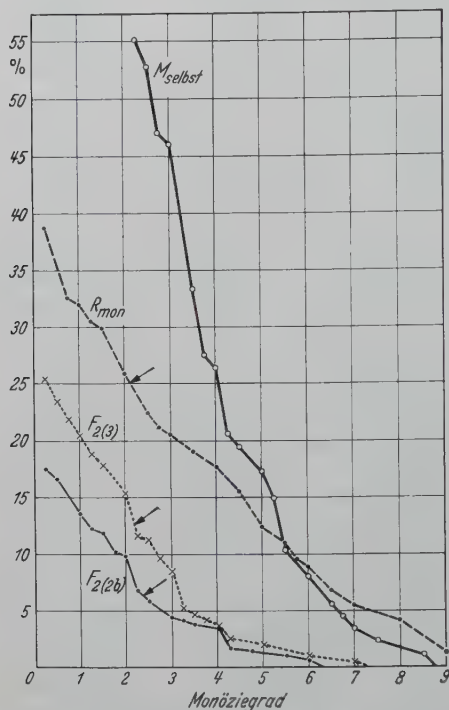


Abb. 2. Sommerversuch 1957, wie Abb. 1.
 — Monöziestenselbstung; --- Rückkreuzung mit monözischem Elter; $F_2(3)$;
 — $F_2(2b)$

($F_2(2b)$) war aus Bestäubung mit demselben F_1 -Männchen hervorgegangen, das auch als Vater der $F_2(2a)$ der Aussaat 1956 gedient hatte, die andere hatte einen dritten Vater. Tabelle 2a zeigt die Aufspaltung. Die R_{mon} und die P_{mon} enthielten keine Männchen, die beiden F_2 -Gruppen ebensoviel wie im vorigen Jahre. Die $F_2(2b)$ ist in bezug auf den Monöziestanteil inhomogen; zwei Nachkommenschaften hatten zu wenig Monözisten; sie werden nicht berücksichtigt (Begründung s. unten). Beim Vergleich der Monöziegrade der $F_2(2b)$ und der R_{mon} (Abb. 2) ergibt sich, daß den Monöziegrad 2—2,5 in F_2 6,25%, in R_{mon} 25% der Pflanzen erreicht hatten. Die bestätigt die Hypothese des dihybriden Erbgangs.

Abweichend verhält sich die $F_2(3)$; ihre Kurve erreicht beim Monöziegrad 2—2,5 die doppelte Höhe der $F_2(2b)$. Da die Nachkommenschaften der $F_2(3)$ in bezug auf ihren Monöziestanteil homogen sind, sich aber wahrscheinlich (P 0,05—0,02) von der $F_2(2b)$ unterscheiden, ist anzunehmen, daß ihr Vater

sich vom $F_1 \sigma_2$ unterschied: Wenn er die Konstitution $aabB$ besaß ($F_1 \sigma_2: aabB$), wären, wie gefunden, in $F_2(3)$ statt 6,25% 12,5% doppelthomozygote Monözisten zu erwarten. Diese Annahme bedarf einer Erklärung: Wie unter „Methoden“ beschrieben, waren zur Herstellung der F_1 16 Männchen der Rasse Carmagnola als Bestäuber verwendet worden. Die Rasse Carmagnola enthält Monözieallele, wie aus dem Auftreten zweier Monözisten in der Aussaat 1956 hervorgeht; (das Verhältnis 2/34 ist nach Erfahrungen bei anderen Versuchen allerdings zufällig sehr hoch). Es ist also möglich, daß 1 oder 2 der 16 Carmagnola-Männchen die Konstitution $aABB$ besaßen. Aus $aabb \times aABB$ entstehen zur Hälfte Pflanzen mit der Konstitution $aabB$, wie sie vermutlich das F_1 -Männchen 3 besaß. — Selbstverständlich müssen die Monözieallele der diözischen Eltern auch auf die F_1 -Weibchen vererbt worden sein. Bei Annahme einer Häufigkeit von einem Abweicher unter 10 F_1 -Weibchen kann dies die Monöziestanteile der F_2 -Gruppen

praktisch nicht beeinflusst haben. Es bleibt noch zu beweisen, daß der Vater der $F_{2(3)}$ tatsächlich die Konstitution $aabB$ besaß. In der zeitlich vorangegangenen

Winteraussaart 1956/57 waren 5 kleine F_1 -Nachkommenschaften, 4 Nachkommenschaften der R_{di} und 4 F_2 -Nachkommenschaften angezogen worden. Die beiden letzteren Gruppen hatten das F_1 -Männchen 3 zum Vater. Die Männchenanteile der 3 Gruppen liegen so hoch, wie in den anderen Aussaaten auch (Tabelle 2b). Die Monözistenanteile der Gruppen lassen jedoch im Vergleich zum Sommer 1956 einen Unterschied erkennen. Im Winter 1956/57 haben 10 Summenprozent der Monözisten der R_{di} den gleichen Monöziegrad wie 70% der F_2 (Abb. 3); im Sommer 1956 hingegen hatten 10% Monözisten der R_{di} den gleichen Monöziegrad wie 45% der F_2 (Abb. 1). Aus diözischen Weibchen gehen weder bei Bestäubung mit Männchen der Konstitution $aAbB$ noch mit Männchen der Konstitution $aabB$ (einfach- oder doppelt) homozygote Monözisten hervor. Dagegen muß sich die Zahl der homozygoten Monözisten aus der Kreuzung von F_1 -Weibchen mit solchen Männchen unterscheiden. Die Differenz sollte 18,75% betragen (62,5—43,75%). Der gegenüber der R_{di} vergleichsweise steilere Anstieg der F_2 im Winter 1956/57 zeigt also, daß das F_1 -Männchen 3 mehr Monözieallele enthielt als die F_1 -Männchen 1 und 2.

In der R_{mon} der Aussaat 1956, der F_2 1957 und F_2 1956/57 waren jeweils einzelne Nachkommenschaften — insgesamt 4 — nicht mitgerechnet worden. Sie beeinträchtigten die Homogenität sehr stark, da ihr Monözistenanteil niedriger lag als der der übrigen Nachkommenschaften. Die Mütter dreier abweichender Nachkommenschaften stammten von einem Monözisten. Insgesamt hat dieser Monözist 7 Nachkommenschaften gestellt, von denen die anderen 4 normal waren. Die Auswahl der Monözisten im Sommer 1955 erfolgte rein nach dem Phaenotyp. Es ist daher durchaus möglich, daß zwei von den untersuchten 11 Monözisten die Konstitution $aabB$ statt $aabb$ besaßen. Die Hälfte ihrer F_1 -Nachkommen müßte dann $aABB$, die andere $aAbB$ sein. Damit wäre der zu geringe ♂-Anteil der Hälfte der Nachkommenschaften zu erklären. Von einem anderen Monözisten stammten die vierte abweichende Nachkommenschaft und 2 weitere normale Nachkommenschaften ab.

Es muß noch erwähnt werden, daß in allen 3 Versuchen nur Männchen den männlichen Habitus besaßen. Die Tageslänge stieg in keinem Fall nach Beginn der Blüte an; sie war außerdem so groß, daß nur bei einem Männchen intersexe Blüten ausgebildet wurden. Alle Monözisten und Weibchen besaßen die Wuchsform der Weibchen aus diözischem Hanf.

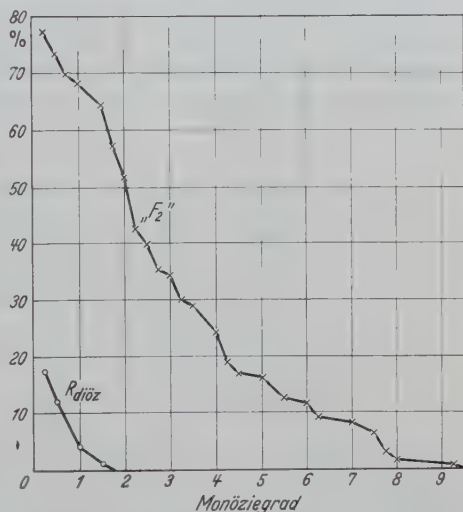


Abb. 3. Winterversuch 1956/57, wie Abb. 1.
 × $F_{2(3)}$; ○ Rückkreuzung mit diözischem Elter

Diskussion

Die Untersuchung hat ergeben, daß die am stärksten männlichen Monözisten zwei nicht allele und nicht gekoppelte Gene im homozygoten Zustand besitzen, und daß schwächere Monözisten weniger als 4 Monözieallele enthalten. Es liegt ein Fall von intermediärer Vererbung vor, wobei allerdings nicht festzustellen ist, ob die Wirkung eines heterozygoten Allelenpaares der eines Normal-Allelenpaares oder eines Monözie-Allelenpaares näherkommt. Dies ließe sich nur beurteilen, wenn es gelänge, auch Pflanzen mit Normal-Allelen zur Ausbildung männlicher Blüten zu veranlassen. Die Monözie-Allele sind ihrer Wirkung nach schwache Männlichkeitsrealisatoren, die sich nur auf das Geschlecht der Pflanzen mit weiblichem Habitus auswirken. Sie werden unabhängig von den Faktoren verteilt, die im diözischen Hanf das Männchen/Weibchen-Verhältnis regulieren (XY). — Mit Gensymbolen lassen sich die Verhältnisse folgendermaßen darstellen:

1. XY	<i>aabb</i>	— XY	<i>AABB</i>	Männchen	Männlicher Habitus
2. XX	<i>aabb</i>				
3. XX	<i>aabb</i>	} ↑ zunehmende Ten- denz, anstelle weib- licher Blüten männ- liche auszubilden			} Weiblicher Habitus
4. XX	<i>aAbb</i>				
5. XX	<i>aaBB</i>				
6. XX	<i>AAbb</i>				
7. XX	<i>aAbB</i>				
8. XX	<i>aABb</i>				
9. XX	<i>AAbB</i>				
10. XX	<i>AABB</i>			Weibchen	

Bei Anzucht im sehr kurzen Tag sind alle Pflanzen mit weiblichem Habitus weiblich. Zwischen welchen Genotypen im Langtag die Grenze zwischen Monözisten und Weibchen verläuft, hängt außer von der absoluten Tageslänge auch von der Lichtintensität, der Düngung und wohl auch von der Temperatur ab. Die Reihenfolge innerhalb der Genotypen 3—6 und 7—9 ist willkürlich angenommen.

v. SENGBUSCH (1952) nimmt eine Reihe von Monözieallelen an, deren schwächer wirksame gegenüber den stärkeren dominant sein sollen. Zum Vergleich mit unseren Ergebnissen soll seine Tabelle 1 c herangezogen werden. Er fand im weiblichen Habitus in der R_{mon} 79%, in der F_2 29% und in der R_{di} 2,5% Monözisten. Der Monöziegrad, der in unserem vergleichbaren Versuch (Abb. 1) der Grenze zwischen Weibchen und Monözisten in v. SENGBUSCHs Versuch entspricht, ist bei Zugrundelegung sowohl der R_{di} als auch der F_2 der Monöziegrad 2. Bis zu diesem Monöziegrad fanden sich in unserer R_{mon} 57% der Pflanzen gegenüber den von v. SENGBUSCH gefundenen 78%. Hier weichen also die Ergebnisse stark voneinander ab. Dafür sind zwei Erklärungen möglich: erstens, daß v. SENGBUSCHs Aussaaten nicht gleichzeitig erfolgten, zweitens, daß bei Herstellung seiner R_{mon} die monözischen Mutterpflanzen nicht vollständig kastriert worden waren, was bei stark männlichen Monözisten im Feldversuch außerordentlich schwierig ist, und daß daher auf Grund unerwünschter Selbstung der Monözistenanteil zu hoch ausfiel.

HOFFMANN (1947) suchte aus seinem monözischen Hanf 810 Weibchen aus, deren Nachkommenschaften er auf ihren Weibchenanteil auszählte. Nehmen

wir an, daß unter den Bedingungen der Hoffmannschen Versuche alle für mindestens ein Monöziesen homozygoten Pflanzen als Monözisten ausgeprägt waren, dazu ein Teil der Doppelt-Heterozygoten, so dürften diese Weibchen die Genotypen $aAbB$, $aABB$, $AAbB$ und $AABB$ gehabt haben. Dabei müßten die einfach Heterozygoten am häufigsten sein, da im monözischen Material die Kombination von 4 Normal-Allelen sehr unwahrscheinlich ist. Diese Weibchen würden nun

von Monözistenpollen (vorwiegend der Konstitution ab , wegen der Pollenüberlegenheit der am stärksten männlichen Monözisten) bestäubt. Die Nachkommenschaften der vier Weibchen-Typen müßten dann 75,50 oder 0% homozygote Monözisten enthalten, dazu noch eine Anzahl doppelt-heterozygoter Monözisten, und zwar am meisten in den Nachkommenschaften, in denen 75% homozygote Monözisten erwartet werden. Diesen Männchenanteilen entsprechen Weibchenanteile von weniger als 25, 50 und 100%. Nach Addition von HOFFMANNs Werten für die 3 Jahre (seine Abb. 6—8) und Glättung der Verteilungskurve durch gleitende Mittelung erhält man eine dreigipfelige Kurve (Abb. 4). Die meisten Nachkommenschaften hatten also einen Weibchenanteil um 45—50%; eine geringere Zahl von Nachkommenschaften enthielt dagegen entweder um 10—15% oder um 90—95% Weibchen. Die Lage der Maxima und ihre Höhe stimmt also mit der

Erwartung überein. Auf eine weitere Auseinandersetzung mit den Werten HOFFMANNs muß verzichtet werden, da seine Werte wegen anderer Klassifizierung nicht mit unseren vergleichbar sind. Nach HOFFMANN (1947, 1952) stellen Monözisten genetische Zwischenstationen auf dem Wege vom Weibchen zum Männchen bzw. umgekehrt dar. Sie sollen entweder aus Männchen durch eine Abschwächung der männlichen Geschlechts- und Habitusfaktoren oder aus Weibchen durch eine Abschwächung der entsprechenden weiblichen Faktoren entstanden sein. Da die Valenzänderung der Geschlechts- und Habitusfaktoren nicht völlig synchron verlaufen muß, können z. B. auch Weibchen den männlichen Habitus besitzen. Für diese Vorstellungen konnten wir keine Belege beibringen. In v. SENGBUSCHs Versuchen und in den hier beschriebenen trat der männliche Habitus nur nach Kreuzung mit Männchen auf und dann in einem sehr konstanten Verhältnis und nur gekoppelt mit dem männlichen Geschlecht. v. SENGBUSCH

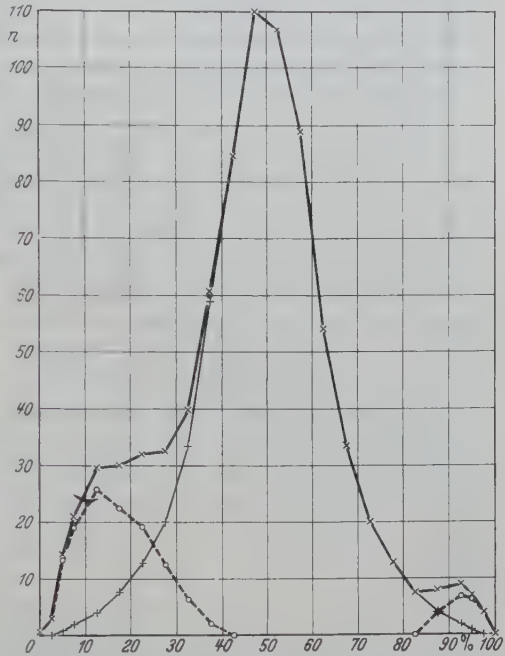


Abb. 4. Anteil der Nichtmonözisten in 810 Nachkommenschaften (Weibchen aus monözischem Hanf $\times$ Monözisten) nach den Werten HOFFMANNs. Abszisse: Prozentualer Anteil an Nichtmonözisten/Nachkommenschaft; Ordinate: Zahl der Nachkommenschaften; $\times$ Gesamtkurve; + Verteilungskurve der überwiegend gefundenen Nachkommenschaften; $\circ$ Verteilungskurve der in geringerer Zahl gefundenen Nachkommenschaften

vermutet, daß HOFFMANN solche Pflanzen als maskulinisiert (mit männlicher Wuchsform) bezeichnet, die er selbst als „Wuchsmutante locker“ des weiblichen Habitus ansieht. HOFFMANN bestätigt diese Vermutung (S. 156), hält aber an seiner Annahme fest, daß die lockere Form den männlichen Habitus darstellt und weist darauf hin, daß das gleichzeitige Auftreten derselben Mutation in 4 Linien recht unwahrscheinlich ist. Wir stimmen mit HOFFMANN überein, daß die lockere Form keine Mutante ist und mit v. SENGBUSCH, daß es sich dabei um den weiblichen Habitus handelt, halten die lockere Form also nur für eine Modifikation des weiblichen Habitus. Es ist nämlich ohne Schwierigkeit möglich, jede weibliche oder monözische Pflanze mit normalem weiblichem Habitus durch Verlängerung des Tages nach Beginn der Blüte in die lockere Form zu verwandeln (KÖHLER, 1958). Die Verwandlung ist bei denjenigen Pflanzen am leichtesten zu erreichen, die bei Normalaussaat am spätesten blühen würden. Bei Aussaat im zeitigen Frühjahr blühen späte und frühe Typen gleichzeitig, bevor die Tageslänge ihr sommerliches Maximum erreicht hat. Daher ist die Häufigkeit lockerer oder maskulinisierter Typen von der Häufigkeit der rezessiven Allele, die einen späten Blühtermin bedingen, abhängig. (Über die Vererbung der photoperiodischen Reaktion wird später berichtet werden.) — Es wurden keine Versuche unternommen, die Abweichungen des Männchen/Weibchen-Verhältnisses vom idealen 1/1-Verhältnis zu klären. Ein Zusammenhang mit der Häufigkeit von Monöziegen kann nicht bestehen, wie bereits im experimentellen Teil festgestellt wurde. Die Männchen traten nämlich in einem ziemlich konstanten Prozentsatz von etwa 42 auf. Sie stammen alle aus der Rasse Carmagnola. Aus dieser Sorte züchtete CRESCINI (1955) Rassen, die ein sehr ähnliches Männchen/Weibchen-Verhältnis besitzen.

Zusammenfassung

Der Vererbungsmodus der Monözie bei Hanf wurde untersucht. Monözisten sind Pflanzen mit der Wuchsform der Weibchen aus diözischem Hanf; sie tragen anstelle einzelner oder mehrerer weiblicher Blüten männliche. Die zugrunde liegenden Faktoren sind als schwach wirksame männliche Realisatoren aufzufassen. Sie haben keinen Einfluß auf die Wuchsform und wirken sich bei Männchen nicht aus. Es sind 2 intermediäre additive und gleichsinnig wirkende Gene. Sie werden unabhängig voneinander und von den Faktoren, die die primären und sekundären Geschlechtsmerkmale im diözischen Hanf bestimmen, verteilt.

Die Untersuchung wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Literatur

- BORTHWICK, H. A., and N. J. SCULLY: Photoperiodic responses of hemp. Bot. Gaz. **116**, 14—29 (1954). — CRESCINI, F.: Selezione artificiale e rapporti sessuali nella Canapa (*Cannabis sativa* L.). Caryologia (Firenze) **7**, 415—419 (1955). Zit. nach Ber. wiss. Biol. **102**, 108. — HESLOP-HARRISON, J.: Auxin and sexuality in *Cannabis sativa*. Physiol. Plantarum (Cph.) **9**, 588—597 (1956). — HIRATA, K.: Sex determination in hemp (*Cannabis sativa*). J. Genet. **19**, 65 (1928). — Cytological basis of the sex determination in *Cannabis sativa*. Jap. J. Genetics **4**, 198—201 (1929). — HOFFMANN, W.: Gleichzeitig reifender Hanf. Züchter **13**, 277—283 (1941). — Die Vererbung der Geschlechtsformen des Hanfes (*Cannabis sativa* L.). I. u. II. Züchter **17/18**, 257 (1947); **22**, 147—158 (1952). — HUHNKE, W., C. JORDAN, H. NEUER u. R. v. SENGBUSCH: Grundlagen für die Züchtung eines monözischen Hanfes. Z.

Pflanzenzüchtg. **29**, 55—75 (1951). — KÖHLER, D.: Die Entwicklung von *Cannabis sativa* unter dem Einfluß verschiedener Tageslängen. *Physiol. Plant.* **11**, 249—259 (1958). — MACKAY, ELIZABETH: Sex chromosomes of *Cannabis sativa*. *Amer. J. Bot.* **26**, 707—708 (1939). — MAEKAWA, T.: Widerstands- und Selbstregulierungsvermögen gegen Geschlechtsänderung bei Hanfpflanzen und seine Beziehung zur Theorie der Geschlechtsbestimmung. *Jb. wiss. Bot.* **70**, 512—564 (1929). — NEUER, H., u. R. V. SENGBUSCH: Die Geschlechtsvererbung bei Hanf und die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Züchter* **15**, 49—62 (1943). — PETIT, J.: Sur la détermination du sexe chez *Cannabis sativa* dans les conditions expérimentales du Phytotron de Liège. *Bull. Soc. roy. Sci. Liège* **11**, 464—476 (1952). — SCHAFFNER, J. H.: The fluctuation curve of sex reversal in staminate hemp plants induced by photoperiodicity. *Amer. J. Bot.* **18**, 424—430 (1931). — SENGBUSCH, R. v.: Ein weiterer Beitrag zur Vererbung des Geschlechts bei Hanf als Grundlage für die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Z. Pflanzenzüchtg.* **31**, 319—338 (1952).

Dr. D. KÖHLER, Braunschweig, Botanisches Institut der Technischen Hochschule,
Humboldtstraße 1

Aus dem Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien

VERERBUNGSVERSUCHE MIT *DROSOPHILA AMBIGUA* Pom.

Von

ANNA KARLIK

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. März 1958)

Die *obscura*-Gruppe der Gattung *Drosophila* hat bisher vor allem durch den hochgradigen chromosomalen Strukturpolymorphismus vieler Vertreter die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt. Diese wurden dadurch zum Objekt populationsgenetischer Untersuchungen und evolutionistischer Überlegungen. Für keine dieser Arten wurde die Erbanalyse in einem so hohen Ausmaß ausgebaut, wie dies für *Drosophila melanogaster* der Fall ist. Immerhin liegen schon sehr reiche Befunde für die amerikanischen Arten *D. pseudoobscura* und *persimilis* vor. Unter den europäischen Vertretern der Gruppe ist vor allem *D. subobscura* bearbeitet worden (DIS 1939—1956; GORDON, SPURWAY and STREET 1939; SPURWAY 1945; SPURWAY and PHILIP 1952). Eine größere Anzahl von Angaben liegt auch für *D. bifasciata* vor (DIS 1951—1956). Die vorliegenden Untersuchungen an *D. ambigua* sollen einen Beitrag zur vergleichenden Genetik der *obscura*-Gruppe leisten.

D. ambigua Pom. ist bisher aus Mitteleuropa, Italien und England bekannt. Sie dürfte in ihrem Vorkommen auf Europa beschränkt sein. In Österreich ist sie häufig und erreicht in den Köderfängen bisweilen die Häufigkeit von *D. subobscura*. Sie kann leicht auf dem üblichen Nährboden kultiviert werden. Die beste Zuchttemperatur ist 23° C, die Generationsdauer beträgt dann etwa 25 Tage. Bei höherer Temperatur ist die Entwicklung abgekürzt, aber nicht so zuverlässig. Zur Mutationsauslösung wurden die Weibchen mit 2000 r, die Männchen mit 5000 r bestrahlt. Alle im folgenden mitgeteilte Mutationen sind durch Strahlung induziert, nur die Mutation *Bd* ist spontan aufgetreten. Der in den Versuchen verwendete Stamm war frei von Inversionen (MAINX, KOSKE und SMITAL 1952).

D. ambigua zeigt in der Mitose außer dem kleinen kugelförmigen Chromosomenpaar vier V-förmige Chromosomenpaare, von denen eines etwas länger als die anderen und isobrachial ist. Ein kürzeres, heterobrachiales ist das X-Chromosom (BUZZATI-TRAVERSO 1942). Dementsprechend zeigt das Riesenchromosomenbild ein kurzes und acht verschieden lange Elemente (PREVOSTI 1950; MAINX, KOSKE und SMITAL 1952). Wenn man die fünf langen stabförmigen Chromosomen von *D. subobscura* als die Basiskonfiguration der *obscura*-Gruppe auffaßt, läßt sich davon der Chromosomensatz von *D. obscura* (= *obscuroides* Pom.) durch die Annahme ableiten, daß hier das X-Chromosom und 2 Autosomen metazentrisch geworden sind. Die wahrscheinlichste Deutung für das annähernd gleichartige Bild bei *D. ambigua*, *bifasciata* und *tristis* ist die, daß das längste, isobrachiale Autosome aus der Fusion der beiden letzten, bei *D. obscura* noch akrozentrischen Autosomen hervorgegangen ist. So sind dann bei diesen Arten im ganzen vier V-förmige Chromosomen vorhanden, von denen eines ein Fusionsprodukt ist. In der amerikanischen Untergruppe ist es insofern anders, als bei *D. pseudoobscura*, *persimilis* und *miranda* das X-Chromosom aus zwei langen, gleichen

Armen besteht, während sonst noch drei stabförmige Autosomen vorhanden sind. Hier ist es zweifellos, daß das X-Chromosom als ein Fusionsprodukt zwischen dem X-Chromosom der anderen Arten und einem stabförmigen Autosom aufzufassen ist, wie es sich schon aus dem Genbestand ergibt (STURTEVANT und TAN 1937). Dasselbe gilt wohl für die *affinis*-Untergruppe (s. auch PATTERSON and STONE 1952; WHITE 1954). Es wäre demnach zu erwarten, daß bei *D. ambigua* das X-Chromosom nur den Genbestand des allgemeinen Elementes A enthält, während zwei von den Gengruppen der Elemente B, C, D oder E in einer Koppelungsgruppe zusammengefaßt sein müßten (STURTEVANT and NOVITSKI 1941).

Die geschlechtsgebundenen Gene

yellow, y (Dis 27, p. 78). rezessiv. Körperfärbung bräunlichgelb, an schwächer chitinierten Stellen gelb. Frisch geschlüpfte Tiere rein gelb. Flügel gelblich mit gelben Adern. Hoden und Malpighi-Gefäße normal gefärbt. Sehr gut vital. Das Gen ist mit den gleichnamigen Genen von *D. subobscura*, *bifasciata*, *pseudoobscura* und *melanogaster* zu homologisieren.

orange, or (Dis 28, p. 98). rezessiv. Augenfarbe intensiv orangegelb, nach dem Schlüpfen nur wenig nachdunkelnd. Ocellen nur gering in der Färbung aufgehellt. Die Augen erscheinen größer und stärker gewölbt als beim Wildtyp. Der Verlauf des Augenrandes ist, besonders beim Weibchen, gegen die Occipitalregion stärker ausladend. Die Ommatidienzahl ist vermehrt. Aus der Zählung der Ommatidien von je 4 Augen verschiedener Individuen ergaben sich die folgenden Mittelwerte für die Ommatidienzahl: ♀ normal $745 \pm 11,7$, *orange* $1032 \pm 9,94$; ♂ normal $785 \pm 7,1$, *orange* $869 \pm 6,34$. Die Hoden sind viel schwächer pigmentiert als beim Wildtyp und nahezu transparent. Die Malpighi-Gefäße sind bei beiden Geschlechtern durchsichtig farblos statt der normalen grünlich-gelben Färbung. Die Mutante ist sehr schwach vital, ihre Eiproduktion ist sehr gering. Man könnte dieses Gen mit *vermilion* bei *pseudoobscura* und *melanogaster*, bzw. mit *cardinal* bei *subobscura* homologisieren. Für diese Homologisierung spricht die Auslöschung der Pigmentierung in der Kombination von *or* mit *prune* (s. S. 456f.).

white, w (Dis 27, p. 78). rezessiv. Augenfarbe rein weiß, Ocellen weiß. Hoden und Malpighigefäße farblos. Die Augen erscheinen etwas größer als beim Wildtyp, dies ist aber nur eine Folge der Kontrastwirkung gegenüber dem dunklen Kopf. Wie Zählungen der Ommatidien zeigten, ist deren Zahl nicht vermehrt. Vitalität vermindert. Zu homologisieren mit den gleichnamigen Genen bei *subobscura*, *pseudoobscura* und *melanogaster*. Es ist interessant, daß die Mutante *w* bei *subobscura* im männlichen Geschlecht unfruchtbar ist, während sie bei den anderen *Drosophila*-Arten in beiden Geschlechtern gut fertil ist. SPURWAY (1945) führt dies darauf zurück, daß *w*-Tiere wahrscheinlich blind sind und *D. subobscura* das Licht und den visuellen Reiz zur Durchführung der Kopula braucht. Dies ist bei *D. ambigua* nicht der Fall, die, wie andere Arten, auch im Dunklen kopulieren.

Notch, N (Dis 28, p. 98 mitgeteilt als „*Scalloped, Sd*“), dominant, homozygot im Weibchen und hemizygot im Männchen letal. Das heterozygote Weibchen zeigt eine leichte Verdickung aller Längsadern, die in der Umgebung der Quersadern besonders deutlich wird. Am stärksten verdickt ist die 5. Längsader von

der hinteren Querader bis zu ihrem distalen Ende. Bei etwa $\frac{1}{5}$ der Tiere treten an den Flügelspitzen einige leichte Einkerbungen der Flügelfläche auf (Abb. 1). Sonst ist die Flügelgröße und -Form normal. Bei etwa 50% der $N/+-\varnothing$ zeigen sich Unregelmäßigkeiten in der Ausbildung der Makrochaeten durch das Auftreten von zusätzlichen Borsten. Hauptsächlich kommt es zu einer Verdoppelung oder Verdreifachung der Scutellaren, meist asymmetrisch. Die Vitalität der heterozygoten Weibchen ist schwach. Für die Homologisierung des Gens mit

Abb. 1. $N/+$ -WeibchenAbb. 2. ct/ct

Notched von *pseudoobscura* bzw. *Notch* von *melanogaster* und anderen Arten spricht nicht nur der charakteristische Phänotypus, sondern auch die Kopplungsbeziehungen mit *w* (s. später!).

cut, *ct* (Dis 24, p. 77), rezessiv. Borstenbesatz entlang der Costa unregelmäßig, zum Teil unterbrochen, die Borsten erscheinen stärker und etwas länger als beim Wildtyp. Außerdem mehr oder weniger zahlreiche, kleinere oder größere Einkerbungen der Flügelfläche vom Rand her mit Verlust der Behaarung, wobei der Innenrand des Flügels bevorzugt betroffen ist (Abb. 2). Der

Verlauf der Adern ist niemals gestört, Flügelgröße normal. Die Ausprägung des Merkmals ist variabel und greift mehr oder weniger in die Normalform über. Die Manifestation ist beim Männchen stets besser als beim Weibchen. Sie konnte durch fortdauernde Selektion durch mehrere Generationen bedeutend gebessert werden. Im selektierten Stamm beträgt sie beim Männchen 100%, beim Weibchen etwa 98%. Vitalität gut. Zu homologisieren mit den gleichnamigen Genen bei *subobscura*, *obscura* und *melanogaster* bzw. mit *beaded* bei *pseudoobscura*.

Partiell geschlechtsgebundenes Gen

plexus venation, *px* (Dis 27, p. 78), rezessiv. Flügel von normaler Größe und Form. Leichtere aber regelmäßige plexus-Bildungen, besonders im distalen Bereich der 2. und 3. Längsader und der 2. Querader. Die 2. und 3. Längsader sind in ihrem Endabschnitt sehr häufig durch diese plexus-Bildungen der Quere nach verbunden (Abb. 3). Das Merkmal trat zunächst bei einigen Weibchen auf. Durch fortgesetzte Geschwisterinzucht konnte ein Stamm aufgebaut werden, bei dem alle Weibchen das Merkmal mit gleichmäßiger Expressivität zeigen, die Männchen jedoch nicht. Die Vitalität und Fertilität der Weibchen ist nicht

stärker beeinträchtigt. Der Erbgang des Merkmals ist partiell geschlechtsgebunden, wobei das mutierte Allel im X-Chromosom, das Normalallel im Y-Chromosom zu lokalisieren ist. Die Männchen des Stammes übertragen das mutierte Allel mit ihrem X-Chromosom, sind jedoch phänotypisch normal. Der Beweis für diese Annahme wurde durch die folgenden Kreuzungen erbracht: ♀ px/px × ♂ Wildtyp; F_1 ist normal; F_2 : das Merkmal wird nur von Weibchen repräsentiert, in einem Versuch $17,5 \pm 1,01\%$ bei $n = 1399$, in einem anderen Versuch $19,9 \pm 0,54\%$ bei $n = 5386$. Die Abweichung dieser Beträge von den bei partiell geschlechtsgebundenem Erbgang zu erwartenden 25% Weibchen ist auf die geringe Vitalität der px/px -Tiere zurückzuführen. Bei autosomalem Erbgang mit geschlechtsbegrenzter Manifestation wären nur 12,5% px/px -Weibchen in der F_2 zu erwarten. Die reziproke Kreuzung ♀ Wildtyp × ♂ px/Y (phänotypisch normal) ergab eine normale F_1 , in der F_2 traten auch nur normale Tiere auf, wie dies bei partiell geschlechtsgebundenem Erbgang zu erwarten ist (403 ♀

Abb. 3. px/px -Weibchen

und 344 ♂ bei $n = 747$; 985 ♀ und 807 ♂ bei $n = 1792$; in allen diesen Versuchen war ein leichter ♀-Überschuß zu beobachten). Das Fehlen von px/px -♀ in diesem Versuch wäre mit der Annahme eines autosomalen Erbganges bei geschlechtsbegrenzter Manifestation nicht vereinbar. Die Heterozygotie der F_1 -♀ dieses Versuches konnte durch Rückkreuzung mit px/Y -♂ bewiesen werden. Bei $n = 3349$ traten 1250 normale ♀, 507 px -♀ und 1592 ♂ auf. Die Asymmetrie zwischen den zu gleichen Teilen zu erwartenden Klassen ist hier allerdings besonders groß.

In den Kulturen des reinen Stammes treten regelmäßig 0,5—3% Männchen auf, die das Merkmal px in verstärktem Ausmaß zeigen. Die Flügel haben reiche plexus-Bildungen über die ganze Fläche, die verdünnt und vielfach geknittert erscheint. Die Flügel sind kleiner als beim Wildtyp, werden nur unvollkommen entfaltet und etwas vom Körper abgespreizt getragen. Diese Männchen sind kleiner als normale Tiere, nur schwach vital und haben sich stets als steril erwiesen. Man kann ihr Auftreten durch die Annahme von primärem Nicht-Trennen der X-Chromosomen bei der Eibildung erklären. Wenn ein sonst ♀-bestimmendes Spermium mit dem px -führenden X-Chromosom ein Ei ohne X-Chromosom befruchtet, entsteht ein Männchen ohne Y-Chromosom, das offenbar das Merkmal px in verstärktem Ausmaß manifestiert, schwach vital und steril ist. Für diese Deutung spricht die Tatsache, daß der gleiche Prozentsatz von sterilen Ausnahmемännchen mit px auch in allen jenen Kreuzungen aufgetreten ist, in denen ein px/Y -Vater verwendet worden war, z. B. in der F_1 der oben genannten Kreuzung ♀ Wildtyp × ♂ px/Y und in der Rückkreuzung ♀ $px/+$ × ♂ px/Y . Diese Ausnahmen fehlten jedoch immer dann, wenn der Vater ein normales X-Chromosom hatte, z. B. in der F_1 der Kreuzung ♀ px/px × ♂ Wildtyp. Das Allel px konnte bisher nicht aus dem X- in das Y-Chromosom gebracht werden.

Vielleicht ist bei *D. ambigua* der Austausch im männlichen Geschlecht ähnlich wie bei *D. melanogaster* praktisch aufgehoben, oder aber es ist der locus für *px* sehr eng mit dem geschlechtsbestimmenden Anteil des Y-Chromosoms gekoppelt. Es ist jedenfalls sehr auffallend, daß hier ein neues partiell geschlechtsgebundenes Gen aufgedeckt werden konnte, während bei *D. subobscura* und *pseudoobscura* ebenso wie bei *D. melanogaster* und anderen Arten nur der an einem Ende des X-Chromosoms gelegene locus *bobbed* als ein dem X- und dem Y-Chromosom gemeinsames Gen bekannt ist.

Die Koppelungsverhältnisse im X-Chromosom

Zwischen *y* und *or* ergab sich bei einer realen Gesamtzahl von 16233 Tieren ein Austausch von $4,91 \pm 0,17\%$, bei Korrektur unter Aufrundung der durch geringere Vitalität benachteiligten Klassen beträgt der Austausch $4,57 \pm 0,14\%$.

Zwischen *y* und *w* war der Austausch bei einer realen Zahl von 10037 Tieren $36,05 \pm 0,48\%$. Hier ist infolge der schlechteren Vitalität von *w* die Asymmetrie zwischen den genotypisch verschiedenen belasteten Klassen sehr groß. Nach Korrektur dieser Asymmetrie beträgt der Austausch $33,68 \pm 0,39\%$.

Die Koppelungsverhältnisse zwischen *or* und *w* wurden an den F_2 -Männchen der Kreuzung ♀ *or/or* × ♂ *w/Y* geprüft. Auch hier ist die Asymmetrie zwischen den verschiedenen belasteten Klassen groß. Nach Korrektur ergab sich bei $n = 1176$ ein Austauschwert von $32,5 \pm 1,37\%$. Dieser Wert ist eher die Differenz als die Summe der obigen korrigierten Werte 33,68 und 4,57%. Die Reihenfolge der loci in der theoretischen Chromosomenkarte wäre also mit *y—or—w* anzunehmen, wobei *y* und *or* relativ eng benachbart, *w* in weiterer Entfernung davon liegen.

Austausch zwischen *N* und *w* wurde unter 4063 Tieren nur bei $0,41 \pm 0,1\%$ beobachtet; er betrug nach Korrektur $0,46 \pm 0,08\%$. Die enge Koppelung des locus *N* mit *w* spricht unbedingt für seine Homologisierung mit *Notch* der anderen *Drosophila*-Arten, da es eine allgemeine Erfahrung ist, daß der Genblock, der *w* und *N* enthält, trotz der verschiedensten Umordnungen des genischen Materials im Laufe der Phylogenie stets konserviert bleibt (STURTEVANT and NOVITSKI 1941).

Die Versuche zur Lokalisierung des partiell geschlechtsgebundenen *px* im X-Chromosom waren durch den Umstand erschwert, daß das Merkmal nur im homozygoten Zustand im Weibchen sichtbar ist. Soviel man bisher sagen kann, scheint *px* mit *w* relativ stark, dagegen mit *y* nur sehr locker gekoppelt zu sein.

Wenn man aus den wenigen bisherigen Anhaltspunkten einen Vergleich zwischen der Anordnung des Genbestandes bei *D. ambigua* und der bei den anderen Arten der *obscura*-Gruppe bzw. bei *D. melanogaster* ziehen will, so kann man zunächst feststellen, daß wie erwartet im X-Chromosom von *D. ambigua* tatsächlich nur Gene ermittelt werden konnten, die mit bekannten Genen des Grundelementes A zu homologisieren sind. Ferner fällt es auf, daß das partiell geschlechtsgebundene *px* an einem Ende des X-Chromosoms zu liegen scheint, ähnlich wie *bobbed* bei *D. subobscura* und *melanogaster* und auch bei *pseudoobscura*, wo es an dem proximalen Ende des mit dem bei anderen Arten autosomalen Element D fusionierten X-Chromosoms liegt. Das andere Ende des X-Chromosoms von *D. ambigua* erscheint bisher durch *y* markiert, wie dies

auch bei *D. melanogaster* der Fall ist, während dieses Gen bei *D. subobscura* und *pseudoobscura* weit gegen das entgegengesetzte Ende verlagert ist. Das Gen *w* ist jedoch auch bei *D. ambigua* ähnlich wie bei *subobscura* und *pseudoobscura* vom distalen Chromosomenende gegen das andere Ende verlagert, sodaß seine relativ nahe Nachbarschaft mit *y* hier verloren gegangen ist, die bei *melanogaster* vorhanden und auch bei *subobscura* und *pseudoobscura* mehr oder weniger erhalten geblieben ist. Das gleiche gilt für das in Blockverbindung mit *w* verlagerte *N*. Das sonst in der Mitte oder gegen das proximale Ende zu liegende Gen *vermilion* scheint bei *D. ambigua* durch das nahe bei *y* liegende *or* vertreten zu sein. Es sind also auch hier in der Phylogenie verschiedene Umlagerungen des genischen Materials innerhalb des Elementes A durch Inversionen anzunehmen, wobei allerdings die terminale Lage einer partiell geschlechtsgebundenen, also auch im Y-Chromosom vertretenen Zone und der charakteristische Genblock *N-w* erhalten geblieben sind.

Autosomale Gene

prune, *pn* (Dis 27, p. 78), rezessiv. Augenfarbe bei gealterten Tieren transparent rötlichbraun, bei frisch geschlüpften stark transparent hell gelblichbraun, am Rande stark aufgehellt, beim Altern erst allmählich in die endgültige Farbe nachdunkelnd. Augen deutlich kleiner als beim Wildtyp, schwächer gewölbt, Augenumfang mehr spitz oval. Die regelmäßige Anordnung der Ommatidien ist durchwegs gestört, und der Haarbesatz des Auges besteht aus stärkeren und dunkleren Borsten. Infolge der Unregelmäßigkeit der Ommatidienordnung konnte keine Zählung der Ommatidien vorgenommen werden, doch scheint ihre Zahl gegenüber dem normalen Auge herabgesetzt zu sein. Ocellen normal. Vitalität gut. Die Mutante läßt sich am besten mit *brown* bei *D. melanogaster* bzw. mit *purple* bei *pseudoobscura* vergleichen, obwohl dort der anatomische Bau des Auges nicht gestört erscheint. Für eine Homologisierung mit diesen Genen spricht der Umstand, daß die homozygote Kombination von *pn* mit *or* fast weiße Augen ergibt, so wie die Kombination von *bw* mit *v* bei *melanogaster* und von *purple* mit *vermilion* bei *pseudoobscura* (MAINX 1939).

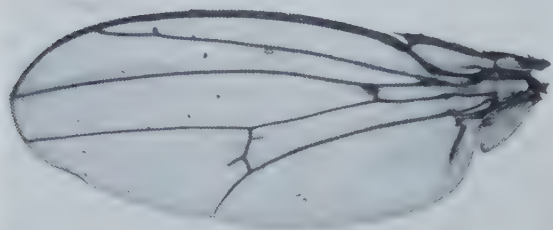


Abb. 4. *Bd/* :

Beaded, *Bd* (Dis 25, p. 94), dominant, homozygot letal. Im heterozygoten Zustand sind die Flügel vom Innenrand her mehr oder weniger tief ausgeschnitten, bei extremer Ausbildung liegen auch am Außenrand mehr oder weniger ausgedehnte Defekte (Abb. 4). Vor allem ist die 2. hintere Zelle betroffen, weiterhin die 3. Zelle, deren Basalteil aber stets bis auf leichte Defekte des Randes erhalten bleibt. Die 2., 3. und 4. Längsader bleiben in der Regel bis zum Ende erhalten, während die 5. entsprechend der Ausdehnung der Defekte verkürzt wird. Bei stärkeren Defekten fehlt auch die hintere Querader ganz oder teilweise. Die Defekte vom Außenrand her betreffen mit die 1. Längsader (Abb. 4). Haltung

der Flügel normal, ihre Funktion nicht betroffen. Die Expressivität des Merkmals besserte sich durch Selektion im Verlaufe mehrerer Generationen, auch verringerte sich dabei deren Schwankungsbreite. Es besteht kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Vitalität der Heterozygoten ist gut. Das Allel entspricht in der Wirkungsweise ganz dem *Beaded* bei *D. melanogaster*.

blistered, *bs* (Dis 30, p. 98), rezessiv. Flügel kleiner, Flügelfläche dünn und wellig geknittert, zwischen den Queradern und dem inneren Flügelrand stets eine größere Blasenbildung. Plexus-Bildungen im Gebiet der Marginalzelle, der

Abb. 5. *pw/pw*Abb. 6. *ci/ci*

2. Querader und besonders der Submarginalzelle. Die Flügel werden vom Körper leicht abgespreizt getragen und sind zum Fliegen kaum brauchbar. Das Allel ist nicht vollkommen rezessiv. Die Heterozygoten zeigen hie und da sehr leichte plexus-Bildungen in den genannten Partien des Flügels. Vitalität gut.

plexus wing, *pw*, semi-dominant. Form und Größe des Flügels normal. Kleine plexus-Bildungen im distalen Abschnitt der Submarginalzelle und im Gebiet der 2. Querader mit Schwankungen in der Expressivität. Eine auf der 2. Querader senkrecht stehende, gegen den Hinter-

rand verlaufende, zusätzliche kurze Aderbildung ist stets vorhanden (Abb. 5). Das Merkmal ist trotz der durch viele Generationen fortgesetzten Selektion im homozygoten Zustand nicht voll manifest. Nur etwas über 50% der Homozygoten zeigen das Merkmal. Die Penetranz bleibt zwischen 17 und 23° C unverändert und ist unabhängig vom Geschlecht. Im heterozygoten Zustand verhält sich das Allel semidominant, 30—37% der Heterozygoten zeigen das Merkmal in voller Ausprägung. Nach Kreuzung mit dem Wildstamm sinkt die Penetranz in den Folgegenerationen ab. Das Merkmal hat eine gewisse Ähnlichkeit mit *px*, der stärkste Ausbildungsgrad von *pw* ähnelt der schwächsten Erscheinungsform von *px*. Nach Kreuzung der beiden Stämme erhält man in der F_2 -Generation Weibchen, die das Kombinationsbild der beiden Faktoren zeigen. Die Wirkungen der beiden Faktoren verstärken einander über das Ausmaß einer rein additiven Wirkung. Die Flügel sind wohl von normaler Größe, aber in ihrer Fläche verknittert und durch plexus- und Blasenbildungen stärker deformiert als dies nach der Wirkung der einzelnen Allele zu erwarten wäre. Vitalität gut.

cubitus interruptus, ci (Dis 27, p. 78), semidominant. Form und Größe der Flügel normal. Die 4. Längsader fehlt in ihrem distalen Abschnitt bis zur hinteren Querader vollständig oder teilweise, bei extremer Ausbildung ist die 4. Längsader noch weiter verkürzt, so daß die Verbindung der hinteren Querader mit ihr gegen die Flügelbasis rückverlagert erscheint und die Querader in einem Bogen aus dem basalen Rest der 4. Längsader zur Insertionsstelle in der 5. verläuft. Dann ist auch die 5. Längsader manchmal etwas verkürzt und der Flügelrand entsprechend leicht eingebuchtet (Abb. 6). Der Ausprägungsgrad des Merkmals schwankt innerhalb der angegebenen Grenzen, ist aber stets auf beiden Flügeln symmetrisch gleich. Nach Isolierung des Allels waren die Schwankungen der Expressivität größer und erreichten auch bei Homozygoten manchmal den Wildtyp. Erst durch Selektion durch mehrere Generationen wurde der Schwankungsbereich charakteristisch eingeengt. Dies gilt für eine Zuchttemperatur von 23° C. Bei 17° C sind die Expressivitätsschwankungen sehr groß, und ein größerer Teil der Homozygoten zeigt normale Flügel. Die Heterozygoten zeigen bei 23° C in beiden Geschlechtern zu 9—15% das Merkmal in schwacher Ausprägung. Vitalität gut.

cutlike, cl (Dis 28, p. 98), rezessiv. Größere oder kleinere Einkerbungen des Flügelrandes, besonders am Innenrand. In der Erscheinungsform steht das Merkmal zwischen *ct* und *Bd*. Starke Expressivitätsschwankungen bis zum Übergang in den Wildtyp, ohne wesentlichen Einfluß der Temperatur. Durch Selektion konnte die Expressivität und Manifestation gebessert werden, bis fast 100% bei den Weibchen, bei den Männchen nur geringer. Vitalität gut.

crossveinless, cv (Dis 24, p. 77), rezessiv. Die hintere Querader fehlt ganz oder zum Teil. Bei extremer Ausprägung fehlt auch die vordere Querader oder ist unterbrochen. Trotz längerer Selektion Manifestation unvollkommen. Vitalität schwach. Autosomale *cv*-Mutanten sind auch bei anderen Vertretern der *obscura*-Gruppe bekannt.

short, sh (Dis 24, p. 77 als „shortened“) und *short², sh²* (Dis 30, p. 98), rezessiv. Diese beiden zu verschiedenen Zeiten aufgetretenen Faktoren sind Allele. Bei *sh* zeigt sich meist nur eine Verkürzung der 2. Längsader, im Extremfall auch der 4. und 5. Die Widerstandskraft der Flügelfläche gegen Verletzungen ist durch die Verkürzung der Adern herabgesetzt. Trotz fortgesetzter Selektion ist die Manifestation des Merkmals nicht vollkommen. Sie ist von der Temperatur unabhängig und beim Weibchen etwas besser als beim Männchen. Das gleiche gilt für *sh²*, das im übrigen etwas stärker wirksam ist als *sh*. Hier ist die 4. Längsader oft über die hintere Querader hinaus verkürzt, so daß diese einen bogenförmigen Verlauf zur ebenfalls verkürzten 5. Längsader nimmt. Die 2. Längsader kann in diesen Fällen ganz fehlen. Vitalität schwach.

delta, dl (Dis 27, p. 78), rezessiv. Δ -Bildung an der Verbindungsstelle der hinteren Querader mit der 4. Längsader, oft unsymmetrisch ausgeprägt, nicht voll manifest, man findet alle Übergänge zum Wildtyp. Vitalität gut.

subcosta, sb (Dis 27, p. 78), rezessiv. Im distalen Abschnitt zeigt sich eine vollständige oder unterbrochene Verbindungsader zwischen der Subcosta und der Costa, im Extremfall zwei derartige Verbindungen. Manifestation unvollkommen. Vitalität schwach.

vestigial, vg (Dis 23, p. 80), rezessiv. Aussehen genau so wie *vg* bei *D. melanogaster*, hie und da traten Formen auf, die an *vg-strap* von *melanogaster* erinnerten. Die Halteren sind in allen Fällen reduziert. Die Tiere sind flugunfähig. Das Merkmal trat zweimal zu verschiedenen Zeiten auf und konnte dann durch etwa 10 Generationen verfolgt werden, in denen immer wieder einzelne Männchen Träger des Merkmals waren. Im ganzen konnten über 60 Männchen beobachtet werden. Diese erwiesen sich sämtlich als schwach vital und völlig unfruchtbar. Das innere und äußere Genitale war normal entwickelt, es konnten auch reife Spermien nachgewiesen werden. Kopulationsversuche der Männchen wurden nicht beobachtet. Es ist anzunehmen, daß dieses rezessive Allel im weiblichen Geschlecht homozygot als Letalfaktor, im männlichen Geschlecht — homo- oder hemizygot — als Subvitalfaktor wirkt.

outspread, od (Dis 23, p. 80), rezessiv. Die Flügel sind etwas verkleinert und werden vom Körper waagrecht abgespreizt getragen. Die Tiere sind flugunfähig. Auch dieses Merkmal wurde nur bei Männchen gesehen. Durch 2 Generationen konnten 13 Tiere festgestellt werden, die sich alle als unfruchtbar erwiesen. Die Männchen hatten normal entwickelte Geschlechtsorgane und führten auch Kopulationsversuche aus. Für eine Deutung der Allelwirkung gilt das bei *vg* gesagte.

extended, ex (Dis 30, p. 98), rezessiv. Flügel etwas verkleinert, nach hinten zu verschmälert, die 5. Längsader etwas verkürzt, die hintere Querader schräg verlaufend. Die Flügel werden vom Körper leicht abgespreizt getragen und nicht zum Fliegen benutzt. Das Merkmal wurde durch mehr als 12 Generationen beobachtet, in denen es immer wieder aus den Heterozygoten herauspaltete. Es traten Weibchen und Männchen auf, die aber stets sehr schwach vital und völlig unfruchtbar waren. Auch hier scheint es sich um einen Subvitalfaktor zu handeln.

Wenn man die bisher aufgetretenen Mutanten mit autosomalem Erbgang betrachtet, so fällt es auf, daß für die Manifestation bzw. Expressivität ihrer Merkmale vielfach Modifikationsfaktoren von Polygencharakter mit eine Rolle spielen müssen, so bei den Mutanten *ct*, *Bd*, *pw*, *ci* und *cl*, bzw. daß eine vollkommene Manifestation überhaupt nicht zu erzielen war, so bei den Mutanten *sh*, *dl* und *sb*. Dies scheint eine für *D. ambigua* besonders charakteristische Erscheinung zu sein, die in diesem Ausmaß bei anderen *Drosophila*-Arten nicht vorzuliegen scheint. Die homozygot als Subvitalfaktoren wirkenden Allele *vg*, *od* und *ex* sind vielleicht durch gröbere chromosomale Defekte bewirkt.

Über die Koppelungsverhältnisse im autosomalen Bereich können noch keine bestimmten Angaben gemacht werden. Die meisten der angeführten Mutanten eignen sich leider nicht sehr für solche Untersuchungen. Wo Modifikationsgene mit im Spiel sind, geht die gute Manifestation der Merkmale gleich verloren, wenn sie aus den ingezüchteten Stämmen ausgekreuzt werden. Soviel bisher festgestellt werden konnte, besteht im Weibchen eine schwache aber gesicherte Koppelung zwischen *Bd* und *pn*. Zwischen *bs* und *pn*, ebenso zwischen *bs* und *Bd*, herrscht freie Rekombination.

Über das Zusammenwirken von Genen

Die Kombinationen der rezessiven Allele für die Augenfarbe *or*, *pn* und *w* zeigen verschiedene Besonderheiten von allgemeinerem Interesse. Das normale

Auge zeigt im Schnitt grob- und feinkörnige Pigmentmassen von rotbrauner Farbe im ganzen Bereich der sekundären Pigmentzellen und der Corneabildungszellen mit besonderer Häufung der Pigmente in der Höhe des Conus und an der Basalmembran. Die Augen der Mutante *w* sind vollkommen pigmentfrei ohne Veränderung des anatomischen Baues. In den Schnitten durch das Auge von *or* erscheinen die Ommatidien auffallend hoch und sehr regelmäßig angeordnet. Ein rötlichgelbes Pigment ist in feinkörniger Verteilung in der ganzen Ausdehnung der sekundären Pigmentzellen und in den Corneabildungszellen vorhanden, etwas gehäuft in der Höhe des Conus und an der Basalmembran. Im Schnitt durch das *pn*-Auge sind die Ommatidien deutlich kürzer als im normalen Auge, die Linsen erscheinen dicker und dichter gelagert und man bemerkt die Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Ommatidien. Das Pigment ist fast nur in der Höhe des Conus in den sekundären Pigmentzellen vorhanden, wo es in dichter, grobkörniger Lagerung und in dunkel rötlichbrauner Farbe erscheint. Nur sehr wenig Pigment findet sich am Grund der Ommatidien und nur ganz geringe Spuren entlang den Retinulazellen. Das Auge der homozygoten Kombination *pn-or* zeigt bei Aufsicht und im Schnitt die anatomischen Eigentümlichkeiten der Mutante *pn*. Eine Vermehrung der Ommatidien, wie sie durch *or* bewirkt wird, ist nicht festzustellen, die Anordnung der Ommatidien ist ebenso gestört und die Ommatidien sind verkürzt wie bei *pn*. In bezug auf die anatomische Ausbildung ist also die Wirkung von *pn* epistatisch über die von *or*. Die Farbe des *pn-or*-Auges ist weiß mit einem leichten, transparenten, hellrosa Schimmer, besonders am Rand des Auges. Im Schnitt zeigen sich nur geringfügige Reste des grobkörnigen, rötlichbraunen Pigments in der Höhe des Conus. Man kann in Parallele zu den Feststellungen an *D. melanogaster* (MAINX 1938) und *pseudoobscura* (MAINX 1939) annehmen, daß durch *or* und *pn* zwei verschiedene Komponenten der normalen Pigmentierung betroffen werden, so daß in der Kombination der beiden Allele das Auge fast pigmentfrei ist. Nur ist hier bei *D. ambigua* die Verteilung der Braun- und der Rotkomponente in den verschiedenen Schichten des Auges eine andere als bei *D. melanogaster*, wie man aus dem Vergleich der Befunde an Augenschnitten ersehen kann. Daß durch *or* die Braunkomponente nicht vollständig entfernt wird und die Kombination *pn-or* daher nicht ganz pigmentfrei ist, spricht besonders für dessen Homologisierung mit *vermilion* bei *melanogaster* und *pseudoobscura*, wo sich dies ebenso verhält. Die Kombination *or-w* hat völlig pigmentfreie Augen, ebenso wie *w*. Der anatomische Bau des Auges entspricht der Mutante *w*, also auch dem Wildtyp. Von der durch *or* allein bewirkten Vermehrung der Ommatidienzahl und ihrer Verlängerung im Querschnitt ist nichts zu bemerken. Hier liegt der merkwürdige Fall vor, daß bei *or* durch eine Pigmentdefektwirkung gleichzeitig eine „positive“ Wirkung im Sinne einer Vermehrung und Verlängerung der Ommatidien bewirkt wird, durch einen weiteren Pigmentdefekt bei Hinzutreten von *w* diese „positive“ Wirkung von *or* aber wieder epistatisch aufgehoben wird.

Zusammenfassung

1. Es werden 5 geschlechtsgebundene, 1 partiell geschlechtsgebundene und 13 autosomal vererbte neue Mutationen von *Drosophila ambigua* mitgeteilt, die fast alle durch Röntgenbestrahlung ausgelöst worden sind.

2. Für das X-Chromosom wird der Entwurf einer theoretischen Chromosomenkarte vorgelegt.

3. Es wird die Homologisierung dieser Mutationen mit denen bei anderen Arten der *obscura*-Gruppe und bei *Drosophila melanogaster* versucht. Das X-Chromosom von *D. ambigua* entspricht in seinem Genbestand dem allgemeinen Element A der anderen Arten. Die Anordnung der loci ist offenbar durch verschiedene Inversionen im Laufe der Phylogenie verändert worden, wobei der Genblock *Notch-white*, ebenso wie bei anderen Arten, erhalten geblieben ist.

4. Feststellungen über das Zusammenwirken verschiedener Gene unterstützen deren Homologisierung mit den Genen anderer Arten.

Die Verf. dankt Herrn Prof. F. MAINX für die Anregung zu dieser Arbeit und seinen Rat bei ihrer Durchführung.

Literatur

BUZZATI-TRAVERSO, A.: Genetica di Popolazioni in *Drosophila*. II. I cromosomi di 5 specie del „Gruppo *obscura*“ e la incrociabilità di varie razze geografiche. Sci. genet. (Torino) **2**, 1—18 (1942). — *Drosophila* Information Service, 11—30, 1939—1956. — GORDON, C., H. SPURWAY and P. A. R. STREET: An analysis of three wild populations of *Drosophila subobscura*. J. Genet. **38**, 37—90 (1939). — MAINX, F.: Analyse der Genwirkung durch Faktorenkombination. Versuche mit den Augenfarbenfaktoren von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 256—276 (1938). — L'azione dei geni per il colore degli occhi di *Drosophila pseudoobscura* in combinazioni e la loro omologazione con i geni di *Drosophila melanogaster*. Sci. genet. (Torino) **1**, 236—241 (1939). — MAINX, F., TH. KOSKE u. E. SMITAL: Untersuchungen über die chromosomale Struktur europäischer Vertreter der *Drosophila obscura*-Gruppe. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 354—372 (1953). — PATTERSON, J. T., and W. S. STONE: Evolution in the Genus *Drosophila*. New York 1952. — PREVOSTI, A.: Cromosomas gigantes de las glándulas salivales de cuatro especies europeas de *Drosophila*, pertenecientes al grupo de la „*obscura*“. Genet. Iberica **2**, 185—192 (1950). — SPURWAY, H.: The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. I. Element A. Sex-linked mutants and their standard order. J. Genet. **46**, 268—286 (1945). — SPURWAY, H., and U. PHILIP: Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. VII. Abnormal gene arrangements in element A. J. Genet. **51**, 198—215 (1952). — STURTEVANT, A. H., and E. NOVITSKI: The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. Genetics **26**, 517—541 (1941). — STURTEVANT, A. H., and C. C. TAN: The comparative genetics of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **34**, 415—432 (1937). — WHITE, M. J. D.: Animal Cytology and Evolution, 2. edit. Cambridge 1954.

Dr. ANNA KARLIK, Institut für Allgemeine Biologie der Universität
Wien IX, Schwarzspanierstr. 17

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln, Abteilung für Mikrobiologie

ZUM PROBLEM DER GENETISCHEN REKOMBINATION VON BAKTERIOPHAGEN

DIE HYPOTHESE DER KOMPLETTEN KOOPERATION

Von

CARSTEN BRESCH und PETER STARLINGER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Mai 1958)

Im Jahre 1953 faßten VISCONTI und DELBRÜCK die Ergebnisse der genetischen Rekombination von Phagen zu einer mathematisch formulierten Theorie, der sogenannten mating-Theorie, zusammen (VISCONTI und DELBRÜCK 1953). Sie basiert im wesentlichen auf folgenden Grundlagen:

Die Phagen vermehren sich im Bacterium als sogenannte vegetative Partikel, von denen jedes die *komplette* genetische Information trägt. Während der Entwicklung kommt es zu *Paarungen* (matings) zwischen je *zwei* dieser Strukturen. Die einzelnen Paarungen sind zufällig in bezug auf ihren Zeitpunkt und die beteiligten Partner. Unterscheiden sich die Paarungspartner in mehr als einem genetischen Merkmal, so kann der Vorgang der Paarung zur Bildung von Rekombinanten führen.

Der entscheidende Parameter einer solchen Vorstellung ist die mittlere Paarungserfahrung pro Phage (m). Sie ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit von Paarungen während des Infektionszyklus und steigt in dieser Zeit von einem Wert $m = 0$ zu Beginn der Infektion bis zu einem phagenstammspezifischen Wert zum Zeitpunkt der Lyse der Bakterien an.

Interpretiert man den Mechanismus der Rekombination als crossing over mit einem materiellen Stückaustausch, so erscheint die Annahme einer Paarung zwischen zwei Partnern ohne weiteres einleuchtend. Es gibt jedoch auch andere Modelle des Rekombinationsmechanismus, nach denen eine Rekombination dadurch entsteht, daß eine neue Replika sich an verschiedenen Elternmatrizen bildet. Für eine solche Annahme spricht die unabhängige Entstehung von reziproken Rekombinanten, die von BRESCH für den Phagen *T1* nachgewiesen werden konnte (BRESCH 1955). Nach dieser Vorstellung erscheint es aber möglich, daß mehr als 2 Matrizen bei der Bildung eines neuen Partikels kooperieren. Die Frage nach dem Mechanismus des Überganges der Replika von einer Matrize zur anderen bleibt dabei für die Populationsgenetik von untergeordneter Bedeutung. Im folgenden soll versucht werden, eine mathematische Beschreibung einer derartigen Viel-Eltern-Kooperation zu gewinnen. Dabei soll der Grenzfall behandelt werden, daß *sämtliche* und nicht nur 2 Partikel des Pools die gleiche Chance haben, genetische Teilinformationen für jedes neue Partikel beizusteuern.

Mating-Theorie

Zum besseren Verständnis soll zunächst noch einmal die mating-Theorie für eine 3-Faktor-Kreuzung mit den Genen i , j und k und den dazwischen liegenden Abschnitten I und II kurz behandelt werden.



Außer dem von VISCONTI und DELBRÜCK benutzten Weg lassen sich die Gleichungen der mating-Theorie nach einem Vorschlag von STAHL auch aus einer Differential-Gleichung gewinnen (STAHL 1956). Hierzu bezeichnen wir mit

m die mittlere Paarungserfahrung/Phage.

p_I die Wahrscheinlichkeit der Rekombination der Gene i und j im einzelnen Paarungsakt. (p_I ist dabei die Summe über alle Wahrscheinlichkeiten für eine ungerade Anzahl von Rekombinationsakten zwischen i und j .)

p_{II} das Entsprechende für die Gene j und k .

$p_{I, II}$ die Wahrscheinlichkeit für je eine Rekombination links und rechts vom Mittelgen pro Paarungsakt. (Das heißt, für eine ungerade Zahl von Rekombinationsakten auf beiden Seiten.)

$a_{ijk}(m)$ der Anteil des genetischen Typs ijk an der Gesamtpopulation nach einer mittleren Paarungserfahrung m . Die Indizes i , j und k stehen hierbei als Symbole für die Allele des jeweils betrachteten genetischen Typs. Der Ersatz der Indizes i , j oder k durch einen Punkt bedeutet, daß an dieser Stelle irgendein beliebiges Allel stehen kann. Derartige a -Terme stellen also stets Summen von Anteilen verschiedener genetischer Typen dar. Man beachte besonders, daß $a_{...}(m) = \sum_{ijk} a_{ijk}(m) = 1$ für alle Werte von m , d. h. zu allen Zeiten des Infektionszyklus ist. Weiter sind Terme mit zwei punktierten Indizes Konstanten, z. B. $a_{.j.}$, der Anteil der infizierenden Partikel mit dem betrachteten Allel j im mittleren Gen. Terme mit nur einem punktierten Index sind dagegen ebenso wie a_{ijk} selbst Funktionen von m .

Die jetzt aufzustellende Differential-Gleichung muß die Änderung der a_{ijk} mit steigendem m beschreiben. Diese Änderung da_{ijk}/dm setzt sich aus einem Gewinn- und einem Verlust-Anteil zusammen. Ein Verlust tritt dann auf, wenn ein Partikel vom Typ ijk an einer Paarung teilnimmt, in der eines der betrachteten 3 Gene dieses Partikels durch Rekombination von den beiden anderen getrennt wird. Ein Gewinn ergibt sich, wenn aus einer rekombinierenden Paarung ein Partikel des Typs ijk hervorgeht.

Jeder dieser beiden Anteile besteht aus 3 Summanden, je nachdem ob die Veränderung durch Rekombination (1) nur zwischen i und j oder (2) nur zwischen j und k oder (3) sowohl zwischen i und j als auch zwischen j und k entstanden ist. Dementsprechend ergibt sich z. B. der Gewinnanteil aus einer Doppelrekombination zu

$$+ a_{i.k} a_{.j.} p_{I, II}.$$

Hierbei beschreiben die ersten beiden Faktoren die Wahrscheinlichkeit für eine Paarung von 2 Strukturen, die in der Lage sind, im Falle einer Doppel-

rekombination ein Partikel vom Typ ijk zu liefern. Die Wahrscheinlichkeit für eine derartige Doppelrekombination ist $p_{I, II}$, der dritte Faktor.

In analoger Weise lassen sich auch die übrigen 5 Summanden formulieren. Es ist dabei zu beachten, daß nach einer Rekombination das neu entstandene Partikel einem Elter genetisch gleichen kann. In einem solchen Fall tritt keine Änderung der a_{ijk} ein. Trotzdem wird in der gewählten mathematischen Darstellung ein solches Ereignis *zweimal* berücksichtigt, und zwar einmal als Gewinn und einmal als Verlust. Insgesamt erhält man schließlich auf diese Weise:

$$\frac{d a_{ijk}}{d m} = \left. \begin{aligned} &+ a_{i..} a_{.jk} (p_I - p_{I, II}) - a_{ijk} a_{..} (p_I - p_{I, II}) \\ &+ a_{..k} a_{ij.} (p_{II} - p_{I, II}) - a_{ijk} a_{...} (p_{II} - p_{I, II}) \\ &+ a_{.j.} a_{i..k} p_{I, II} - a_{ijk} a_{...} p_{I, II} \end{aligned} \right\} \quad [1]$$

als Ausgangsgleichung der mating-Theorie.

Hypothese der kompletten Kooperation

Wir müssen jetzt eine analoge Differential-Gleichung für das Modell der Beteiligung von mehr als 2 Parentalstrukturen an der Bildung eines neuen Partikels aufstellen. Dazu muß zunächst die Bedeutung der Paarung für die mating-Theorie untersucht werden.

In der mating-Theorie sind nicht alle Rekombinationsakte voneinander unabhängig, sondern die in der gleichen Paarung stattfindenden sind miteinander „verknüpft“. Sie sollen im folgenden eine „Serie“ genannt werden. An einer solchen Serie sind stets zwei und nur zwei Parentalstrukturen beteiligt. Rekombinationsakte aus verschiedenen Paarungen sind dagegen untereinander nicht verknüpft. Die Paarungserfahrung m beschreibt demnach die durchschnittliche Zahl der *voneinander unabhängigen Serien von untereinander verknüpften Rekombinationsakten*, die pro Partikel stattgefunden haben. Man beachte besonders, daß die Serienerfahrung nur den Partikeln zugeschrieben werden darf, die aus einer Serie als Rekombinanten hervorgehen können.

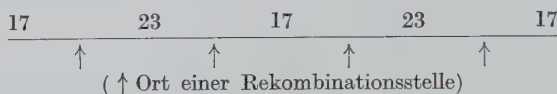
Für die neue Hypothese soll der Begriff der Serie beibehalten werden. Als Serie sollen jedoch ganz allgemein verknüpfte Rekombinationsakte betrachtet werden, ohne daß Ursache oder Art der Verknüpfung näher festgelegt wird. Wir erweitern dabei den Begriff der Serie so, daß auch Serien mit nur einem oder auch gar keinem Rekombinationsakt vorkommen können, so wie es in der mating-Theorie auch Paarungen ohne Rekombinationsakte gibt.

An der Bildung eines neuen Partikels können im allgemeinen keine, eine oder auch mehrere Serien beteiligt sein. Am Ende dieser Serien steht aber stets ein vegetatives Partikel, das seinen Parentalstrukturen gleichberechtigt ist.

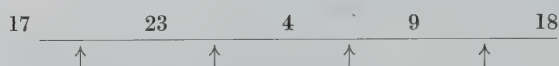
An N verknüpften Rekombinationsakten einer Serie sind aber nicht wie in der mating-Theorie nur 2 Parentalstrukturen beteiligt, sondern (abgesehen von eventuellen Doppelbeteiligungen) $N + 1$ verschiedene Strukturen, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit von allen Partikeln des Pools gestellt werden. Die der mittleren Paarungserfahrung analoge mittlere Serienerfahrung soll mit s bezeichnet werden. Die Serienerfahrung wird auch hier nur denjenigen Partikeln zugeschrieben, die eine Serie als Rekombinanten verlassen können.

Der wesentliche Unterschied der mating-Theorie und der hier vorgeschlagenen Hypothese einer *kompletten Kooperation* aller Strukturen im Pool (*KK-Hypothese*) liegt also im folgendem:

Könnte man alle vegetativen Partikel im Pool zur Zeit der Rekombinationsserie fortlaufend numerieren, so würde im Falle der mating-Theorie die aus einer Serie von z. B. 4 Rekombinationsakten hervorgehende Rekombinante alternierend von Rekombinationsstelle zu Rekombinationsstelle nur 2 Parentalstrukturen (z. B. Nr. 17 und 23) beteiligen:



Nach der *KK-Hypothese* dagegen wären im allgemeinen fünf verschiedene Parentalstrukturen (z. B. Nr. 17, 23, 4, 9, 18) beteiligt:



Die Wahrscheinlichkeit der Rekombination zweier Gene i und j war in der mating-Theorie die Summe der Wahrscheinlichkeiten aller ungeradzahlgigen Rekombinationsakte zwischen i und j . Jede gerade Anzahl von Rekombinationsakten führte zwangsläufig zu der Ausgangsstruktur zurück, d. h. ergab keine Rekombination. Bei der *KK-Hypothese* besteht dagegen für jede gerade oder ungerade Anzahl von Rekombinationsakten ($\neq 0$) die gleiche Rekombinationswahrscheinlichkeit der Gene i und j , gegeben ausschließlich durch die Häufigkeit der Allele im Pool. Es kommt lediglich darauf an, daß das neue Partikel die Gene i und j von den entsprechenden Strukturen hergeleitet hat, ganz gleich wie viele Rekombinationsakte ($\neq 0$) zwischen den Genen auftraten. Die Rekombinationswahrscheinlichkeiten der *KK-Hypothese*, die zur deutlichen Unterscheidung als q_{I} , q_{II} , und $q_{\text{I, II}}$ bezeichnet werden sollen, sind also die Summen aller Wahrscheinlichkeiten für einen oder mehrere Rekombinationsakte zwischen den betreffenden Genen.

Mit diesen Voraussetzungen können wir jetzt in analoger Weise wie beim mating-Modell die gesuchte Differential-Gleichung für die Änderung der a_{ijk} mit steigender Serienerfahrung aufstellen. Sie besteht wiederum aus den entsprechenden 6 Summanden. Eine wesentliche Abweichung von der mating-Theorie ergibt sich nur für die beiden letzten Summanden mit Doppelrekombination. Hierbei tritt an die Stelle der Wahrscheinlichkeit für die Paarung von zwei geeigneten Partikeln ($a_{.j.} a_{i..k}$) die Wahrscheinlichkeit, daß die fraglichen Gene i , j und k gerade von den „richtigen“ Parentalstrukturen hergeleitet wurden ($a_{i..} a_{.j.} a_{...k}$)! Man erhält demnach als Ausgangsgleichung der *KK-Hypothese*:

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{d a_{ijk}}{ds} = & + a_{i..} a_{.jk} (q_{\text{I}} - q_{\text{I, II}}) - a_{ijk} a_{...} (q_{\text{I}} - q_{\text{I, II}}) \\
 & + a_{...k} a_{ij.} (q_{\text{II}} - q_{\text{I, II}}) - a_{ijk} a_{...} (q_{\text{II}} - q_{\text{I, II}}) \\
 & + a_{i..} a_{.j.} a_{...k} q_{\text{I, II}} - a_{ijk} a_{...} a_{...} q_{\text{I, II}}.
 \end{aligned} \right\} \quad [2]$$

Die Differential-Gleichungen [1] und [2] sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich und können in ganz analoger Weise gelöst werden, wenn nur die Rekombinationswahrscheinlichkeiten p bzw. q unabhängig von m bzw. s sind. Weiter ist die

Gültigkeit der mathematischen Formulierungen unter anderem auf nur solche Interpretationen beschränkt, bei denen erstens die zeitliche Ausdehnung der Rekombinationsakte einer Serie für die Pool-Kinetik vernachlässigbar ist und zweitens die einzelnen ijk -Typen untereinander keine Selektionsvorteile zeigen. Einzelheiten des Lösungsweges der Differential-Gleichung [1] und [2] sind im Anhang wiedergegeben. Man erhält als Lösung von [1]:

$$a_{ijk}(m) = A + [a_{ijk}(0) + 2A - A_i - A_j - A_k] e^{-(p_I + p_{II} - p_{I,II})m} \left. \begin{aligned} &+ (A_i - A) e^{-p_{II}m} \\ &+ (A_j - A) e^{-(p_I + p_{II} - 2p_{I,II})} \\ &+ (A_k - A) e^{-p_I m} \end{aligned} \right\} \quad [3]$$

und als Lösung von [2]:

$$a_{ijk}(s) = A + [a_{ijk}(0) + A - A_i - A_k] e^{-(q_I + q_{II} - q_{I,II})s} \left. \begin{aligned} &+ (A_i - A) e^{-q_{II}s} \\ &+ (A_k - A) e^{-q_I s} \end{aligned} \right\} \quad [4]$$

Hierin sind

$$\begin{aligned} A &= a_{i..}, a_{.j.}, a_{..k} \\ A_i &= a_{i..}, a_{.jk}(0) \\ A_j &= a_{.j.}, a_{i.k}(0) \\ A_k &= a_{..k}, a_{ij.}(0) \end{aligned}$$

und

$$a_{i,k}(0)$$

als Konstanten der Anfangsbedingungen (Infektion) bekannt. In den Gleichungen [3] und [4] sind die a_{ijk} als Funktionen dieser Anfangsbedingungen und der Größen p_I , p_{II} , $p_{I,II}$ und m bzw. q_I , q_{II} , $q_{I,II}$ und s gegeben.

In den meisten Fällen besteht jedoch die Aufgabe, umgekehrt aus den experimentellen Werten der a_{ijk} die Rekombinationswahrscheinlichkeiten und die Serienerfahrung zu bestimmen. Dies ist jedoch ohne zusätzliche Annahmen unmöglich, weil aus jeder 3-Faktor-Kreuzung nur 3 voneinander unabhängige Meßgrößen gewonnen werden können, denen 4 gesuchte Parameter gegenüberstehen. Dies wird aus dem folgenden Spezialfall einer 2-Eltern-Kreuzung 111×222 mit beliebigem Infektionsverhältnis

$$a_{111}(0) = \frac{1+f}{2}, \quad a_{222}(0) = \frac{1-f}{2}$$

ersichtlich. Man erhält dann aus den Gleichungen [3] bzw. [4] je 3 unabhängige Bestimmungsgleichungen, und zwar

für die mating-Theorie:

für die KK -Hypothese:

$$\left. \begin{aligned} p_I m &= -\ln \left[1 - \frac{2(a_{12.} + a_{21.})}{1-f^2} \right] = q_I s \\ p_{II} m &= -\ln \left[1 - \frac{2(a_{.12} + a_{.21})}{1-f^2} \right] = q_{II} s \\ (p_I + p_{II} - 2p_{I,II}) m &= -\ln \left[1 - \frac{2(a_{1.2} + a_{2.1})}{1-f^2} \right] = (q_I + q_{II} - q_{I,II}) s \end{aligned} \right\} \quad [5]$$

Hierin sind die mittleren Terme der 3 Doppelgleichungen die aus dem Experiment gewinnbaren, unabhängigen Meßgrößen. Zur Lösung des Systems benötigt man eine weitere Gleichung. Dabei ist es sinnvoll, eine Beziehung zu suchen, die $p_{I,II}$ als Funktion von p_I und p_{II} darstellt, d. h. eine Annahme über eine eventuelle Interferenz zu treffen. Da die Annahme einer vollständigen Interferenz ($p_{I,II}=0$) den an den Phagen $T2$, $T1$ und λ gewonnenen Ergebnissen widerspricht, verbleibt als einzig sinnvolle und mathematisch leicht zugängliche Annahme die eines völligen Fehlens von Interferenz ($p_{I,II}=p_I p_{II}$). Dies bedeutet, daß innerhalb einer Serie die Rekombinationsakte zufällig auftreten und sich gegenseitig nicht beeinflussen. Unter dieser Annahme lassen sich aus dem Gleichungssystem [5] Zahlwerte für die gesuchten Parameter errechnen. Ein Vergleich der beiden Modelle zeigt, daß hierbei $m=2s$ und $p=q/2$ wird. Das heißt unter der Annahme einer kompletten Kooperation würde man den gleichen experimentellen Befund durch halb so große mittlere Serienerfahrung, aber dafür doppelt so große Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsakte interpretieren als bei der mating-Theorie.

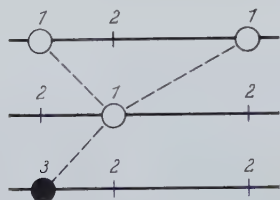


Abb. 1. Schema einer 3 Eltern-3 Faktor-3 Allel-Kreuzung

Für alle 2-Eltern-Kreuzungen mit symmetrischer Infektion ($f=0$) sind die beiden Modelle in sich konsistent und mathematisch ununterscheidbar, weil in diesem Fall stets $A_j - A = a_{ijk}(0) + A - A_i - A_k$ wird. Eine Prüfungsmöglichkeit bietet sich jedoch in 3-Faktor-Kreuzungen mit stark asymmetrischer Infektion,

da sich für diesen Fall unterschiedliche Erwartungen für die Häufigkeit der beiden reziproken Doppelrekombinanten ergeben. Dieser Effekt wird noch anschaulicher bei der Betrachtung einer 3 Eltern-3 Faktor-3 Allel-Kreuzung. Das Schema einer solchen Kreuzung ist $121 \times 212 \times 322$, wenn die Zahlwerte die Allele und die Ziffernpositionen die Gene wiedergeben.

Entscheidend in einer solchen Kreuzung sind die Rekombinantentypen 111 und 311, die als biparentale und triparentale Doppelrekombinanten (Abkürzung BD und TD) bezeichnet werden sollen. Während BD in beiden Vorstellungen aus einer Rekombinationsserie hervorgehen kann, gilt dies für TD nur in der KK-Hypothese. In der mating-Theorie sind zur Bildung von TD zwei Serien erforderlich. Infolgedessen sollte bei Phagen mit relativ kleiner Serienerfahrung, wie z. B. $T1$, bei Gültigkeit der mating-Theorie mehr BD als TD auftreten. Nach der KK-Hypothese sollten dagegen beide gleiche Häufigkeiten haben. Derartige Versuche werden zur Zeit von Dr. R. HAUSMANN durchgeführt.

Interpretationsmöglichkeiten der KK-Hypothese

1. Das Modell der „partial replica“ wurde zurückgehend auf eine Idee von LURIA 1947 durch HERSHEY 1952 vorgeschlagen. Nach dieser Vorstellung, die besonders von DOERMANN und Mitarb. 1955 vertreten wurde, bilden die einzelnen Parentalstrukturen zufällige Teilreplikas, die sich später zu kompletten Partikeln zusammenfinden. Obwohl diese Vorstellung als wichtigste Antithese dem Paarungsmodell gegenüberstand, fehlt bis heute eine befriedigende mathematische Behandlung des Modells. Die mathematische Form der KK-Hypothese bildet

zwar eine Grundlage für eine derartige Betrachtung, doch bleibt die eigentliche mathematische Schwierigkeit noch ungelöst. Diese liegt in der Statistik der Teilreplikas sowie der gebildeten Überlappungen (mit möglicherweise folgenden Sekundärrekombinationen). Diese Schwierigkeit ist in der Funktion $p_{I,II}$ (p_I, p_{II}) zusammengedrängt. Immerhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Grundlage einer partial-replica-Mathematik der der mating-Theorie äußerst verwandt ist.

2. *Das Modell der „aktiven Reduplikation“.* Hierbei soll die Reduplikation entlang einer Matrizenstruktur erfolgen und im allgemeinen „passiv“, d.h. ohne Rekombination verlaufen. Es sollen jedoch auch „aktive“ Reduplikationen vorkommen, bei denen sich ein oder mehrere Rekombinationsakte ereignen. Die Existenz passiver, d.h. rekombinationsunfähiger Reduplikationen muß speziell für Phagen mit kleiner mittlerer Serienerfahrung gefordert werden. Der Grund für den aktiven oder passiven Charakter einer Reduplikation bleibt offen. Die Rekombination selbst besteht in einem Matrizenwechsel der Replika, die nacheinander mehrere Parentalstrukturen benutzen kann. Schematisch ergibt sich folgende bildliche Darstellung dieses Modells (Abb. 2).

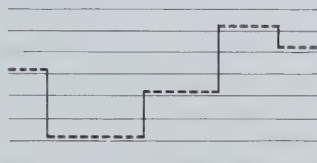


Abb. 2. Schema einer aktiven Reduplikation

3. *Das Modell der „partiellen Paarungen“.* Auch hier erfolgt die Rekombination durch einen Matrizenwechsel (copy choice) während der Reduplikation. Für den Rekombinationsakt ist jedoch eine partielle Paarung zweier Parentalstrukturen erforderlich. Innerhalb einer solchen zufällig auftretenden Paarungsregion erfolgen zufällige Matrizenwechsel. [Derartige Paarungsbereiche wurden erstmalig von PRITCHARD zur Erklärung der negativen Interferenz bei *Aspergillus nidulans* vorgeschlagen (PRITCHARD, 1955)]. An einer partiellen Paarung können nur 2 Parentalstrukturen teilnehmen. Schematisch ergibt sich folgende bildliche Darstellung (Abb. 3).



Abb. 3. Schema einer Reduplikation mit partiellen Paarungen

Das Phänomen der partiellen Heterozygotie (HERSHEY, 1951) kann in die beiden letzten Modelle eingeführt werden, indem der einfache Matrizenwechsel durch einen komplizierteren Vorgang ersetzt wird.

4. *Das Modell des Gedächtnisses.* Während in den bisherigen 3 Vorstellungen eine Rekombinationsserie stets alle Rekombinationsakte umfaßte, die bei der gleichen Reduplikation auftraten, ist das keineswegs eine notwendige Deutung der KK-Hypothese. Es ist ebenso denkbar, daß während einer oder zwischen zwei Reduplikationen mehrere Serien wirksam werden oder auch, daß der Serienzusammenhang sich über mehr als eine Reduplikation erstreckt. Es könnte z.B. durch eine erste zufällige Rekombination während der ersten Reduplikation eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für weitere Rekombinationsakte in der folgenden Reduplikation erzeugt werden. Ein solches „Gedächtnis“ wird allerdings durch

die mathematische Formulierung der *KK*-Hypothese nur dann angenähert beschrieben, wenn die Dauer des Gedächtnisses kurz ist, da sonst die Rekombinationswahrscheinlichkeiten zeitabhängig, d.h. abhängig von der Serienerfahrung werden.

Von den geschilderten Modellen erscheint das der partiellen Paarungen durch seine weitestgehende Annäherung an das Chromosomenverhalten bei Polyploidie von höheren Organismen am plausibelsten. Eine derartige Analogie zwischen der Rekombinationsgenetik höherer Organismen und der von Bakteriophagen wurde bereits von VISCONTI und DEIBRÜCK angestrebt. Die *KK*-Hypothese ist bei dieser Interpretation eine Fortführung dieses Gedankens.

Wir danken den Herren Prof. DELBRÜCK, Prof. DOERMANN, Dr. HAUSMANN und Dr. TRAUTNER für anregende Diskussionen und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Anhang

Es sollen die beiden Differential-Gleichungen [1] und [2] gelöst werden. Diese können in einer gemeinsamen Form:

$$\left. \begin{aligned} \frac{da_{ijk}}{d\tau} = & +(\alpha - \gamma - \delta) a_{i..} a_{.jk} \\ & +(\beta - \gamma - \delta) a_{..k} a_{ij.} \\ & +\gamma a_{i..} a_{.j.} a_{..k} \\ & +\delta a_{.j.} a_{i..k} \\ & -(\alpha + \beta - \gamma - \delta) a_{ijk} \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

zusammengefaßt werden.

Hierbei ist für [1] (mating-Theorie) $\alpha = p_I$; $\beta = p_{II}$; $\gamma = 0$; $\delta = p_{I,II}$; $\tau = m$, und für [2] (*KK*-Hypothese) $\alpha = q_I$; $\beta = q_{II}$; $\gamma = q_{I,II}$; $\delta = 0$ und $\tau = s$.

Zur Lösung von (1) ist zunächst die Bestimmung von $a_{.jk}$, $a_{i..k}$ und $a_{ij.}$ als Funktionen von τ erforderlich. Man gewinnt sie aus der analogen Differential-Gleichung für nur 2 Gene σ und ϱ , mit der Rekombinationswahrscheinlichkeit r , die die folgende Gestalt hat:

$$\left. \begin{aligned} \frac{da_{\sigma\varrho}}{d\tau} = & -r a_{\sigma\varrho} a_{..} \\ & +r a_{\sigma.} a_{. \varrho} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

Die Integration ergibt:

$$a_{\sigma\varrho}(\tau) = a_{\sigma.} a_{. \varrho} - C_{\sigma\varrho} e^{-r\tau} \quad (3)$$

worin $C_{\sigma\varrho}$ die Integrationskonstante ist, die sich aus den Anfangsbedingungen zu

$$C_{\sigma\varrho} = a_{\sigma.} a_{. \varrho} - a_{\sigma\varrho}(0)$$

bestimmt.

Die entsprechenden Ausdrücke für $a_{.jk}$, $a_{i..k}$ und $a_{ij.}$ werden daraus gebildet, wobei zu beachten ist, daß für $a_{i..k}(\tau)$ die Rekombinationswahrscheinlichkeit durch den Ausdruck $(\alpha + \beta - \gamma - 2\delta)$ gegeben wird, da die Doppelbrüche zwar bei einer Rekombination nach der *KK*-Hypothese, nicht aber nach der mating-Theorie beitragen.

Nach Einsetzen in Gleichung (1) nimmt diese folgende Form an:

$$\left. \begin{aligned} \frac{da_{ijk}}{d\tau} = & + (\alpha - \gamma - \delta) [A - (A - A_i) e^{-\beta\tau}] \\ & + (\beta - \gamma - \delta) [A - (A - A_k) e^{-\alpha\tau}] \\ & + \gamma A \\ & + \delta [A - (A - A_j) e^{-(\alpha + \beta - \gamma - 2\delta)\tau}] \\ & - (\alpha + \beta - \gamma - \delta) a_{ijk}. \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

Hierin ist

$$\begin{aligned} A &= a_{i..} a_{.j.} a_{..k}, \\ A_i &= a_{i..} a_{.jk}(0), \\ A_j &= a_{.j.} a_{i..k}(0) \text{ und } A_k = a_{..k} a_{ij.}(0). \end{aligned}$$

Ansatz (4) ist eine Differential-Gleichung des allgemeinen Typs

$$\frac{da}{d\tau} + Ka = f(\tau), \quad (5)$$

zu deren Lösung zunächst die Störfunktion $f(\tau) = 0$ gesetzt wird. Man erhält dann als Lösung der homogenen Differential-Gleichung

$$a(\tau) = B e^{-K\tau}. \quad (6)$$

Wegen der Störfunktion muß jetzt die Variation der Integrationskonstanten erfolgen, die als Funktion von τ aufgefaßt wird. Durch Differenzieren von (6) und Vergleich mit (5) ergibt sich:

$$B(\tau) = \int f(\tau) e^{K\tau} d\tau + C. \quad (7)$$

Durch Einsetzen der Werte aus Gleichung (4) für K und $f(\tau)$ und Integration ergibt sich:

$$\left. \begin{aligned} B_{ijk}(\tau) = & A e^{(\alpha + \beta - \gamma - \delta)\tau} \\ & - (A - A_i) e^{(\alpha - \gamma - \delta)\tau} \\ & - (A - A_k) e^{(\beta - \gamma - \delta)\tau} \\ & - (A - A_j) e^{\delta\tau} \\ & - C_{ijk} \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

Durch Einsetzen von (8) in (6) ergibt sich:

$$\left. \begin{aligned} a_{ijk}(\tau) = & A \\ & + (A_i - A) e^{-\beta\tau} \\ & + (A_k - A) e^{-\alpha\tau} \\ & + (A_j - A) e^{-(\alpha + \beta - \gamma - 2\delta)\tau} \\ & + C_{ijk} e^{-(\alpha + \beta - \gamma - \delta)\tau} \end{aligned} \right\} \quad (9)$$

Die Integrationskonstante ergibt sich aus den Anfangsbedingungen zu

$$C_{ijk} = a_{ijk}(0) + 2A - A_i - A_j - A_k,$$

und durch Einsetzen dieser Konstanten in Gleichung (9) ergibt sich schließlich als Endlösung:

$$a_{ijk}(\tau) = A + \left. \begin{aligned} & (a_{ijk}(0) + 2A - A - A_j - A_k) e^{-(\alpha + \beta - \gamma - \delta)\tau} \\ & + (A_i - A) e^{-\alpha\tau} \\ & + (A_k - A) e^{-\beta\tau} \\ & + (A_j - A) e^{-(\alpha + \beta - \gamma - 2\delta)\tau} \end{aligned} \right\} \quad (10)$$

Diese Gleichung wird durch Nullsetzen von γ oder δ zur gesuchten Lösung des Ansatzes [1] (mating-Theorie), bzw. des Ansatzes [2] (KK-Hypothese). Ist in Gleichung (10) weder γ noch $\delta = 0$, so würde hierdurch ein Rekombinationsgeschehen beschrieben, bei dem ein Teil der Serien nach der mating-Theorie, ein anderer nach der KK-Hypothese ablief.

Summary

The mating theory of VISCONTI and DELBRÜCK describes quantitatively the recombination kinetics in phage. One special assumption of this theory is the *pairwise* mating of complete parental structures randomly chosen from the pool, which can lead to the production of a new recombinant particle. On the other hand it seems possible to assume a mechanism, by which the number of templates involved in the formation of a new replica is not restricted to two particles. The hypothesis of complete cooperation presented here suggests the participation of $N + 1$ random templates in the formation of a new replica carrying N recombination sites. Such a mechanism may be interpreted in different ways, e.g. by a partial replica model or by a partial pairing, which connects more than two parental structures. A differential equation is given, describing this assumption and leading to formulas very similar to those of the mating theory.

Literatur

- BRESCH, C.: Zum Paarungsmechanismus von Bakteriophagen. Z. Naturforsch. **10b**, 545 (1955). — DOERMANN, A. H., M. CHASE and F. W. STAHL: Genetic Recombination and Replication in Bacteriophage. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl. 2, 51 (1954). — HERSHEY, A. D.: Reproduction of Bacteriophage. Int. Rev. Cytol. **1**, 119 (1952). — HERSHEY, A. D., and M. CHASE: Genetic Recombination and Heterozygosis in Bacteriophage. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 417 (1951). — LURIA, S. E.: Reactivation of Irradiated Bacteriophage by Transfer of Self-reproducing Units. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **33**, 253 (1947). — PRITCHARD, R. H.: The Linear Arrangement of a Series of Alleles of *Aspergillus nidulans*. Heredity **9**, 343 (1955). — STAHL, F. W.: Persönliche Mitteilung. — VISCONTI, N., and M. DELBRÜCK: The Mechanism of Genetic Recombination in Phage. Genetics **38**, 5 (1953).

C. BRESCH und P. STARLINGER,

Botanisches Institut der Universität Köln, Gyrhofstraße 15

Kurze Mitteilung

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS

DIE GENETIK EINIGER STRAHLENINDUZIERTER, ABWEICHENDER PLASTIDENFORMEN BEI FARNEN*

Von
R. MALY

(Eingegangen am 9. März 1958)

Vor einigen Jahren wurde über das Ergebnis von Bestrahlungsversuchen an Sporen von *Polypodium aureum* berichtet und die Vielfalt der dabei erhaltenen Abweichungen bezüglich der Plastidenform und -struktur beschrieben (MALY 1951). Bei allen beobachteten Abweichungen zeigte schon die erste Zelle nach der Sporenkeimung den veränderten Phänotyp. Daraus wurde geschlossen, daß die beschriebenen Abweichungen kernbedingt sein müßten und nicht auf Abänderungen im Plasmon oder Plastom beruhen können (l.c. S. 473—474). Ergänzend zu der zitierten Arbeit werden nun einige weitere Beobachtungen und Kreuzungsergebnisse mitgeteilt.

Alle beschriebenen Abweicher hielten sich in jahrelanger (8—10 Jahre) Klonkultur konstant. Das gilt auch für die auf S. 473 (l.c.) erwähnten Typen, die in dem Prothallium blasse bis farblose Sektoren zeigten. Eine Selektion auf rein grün war unmöglich. Mischzellen, d. h. grüne und blasse Plastiden, waren niemals zu finden. Die Abgrenzung der blassen Sektoren gegen die grünen Prothalliumteile war stets ganz scharf, wenngleich die „Initialzelle“ des bleichen Sektors weniger stark ausgebleicht war als ihre Abkömmlinge.

Die Kreuzungen wurden auf Hohlschliffobjektträgern durchgeführt. *Polypodium aureum* ist monöisch. Vor der Kreuzung mußte in den Kulturen (Benecke-Agar in Petrischalen) sorgfältig Kondenswasserbildung vermieden werden. Von den als Mütter dienenden Prothallien wurden Archegonien-tragende Stücke herausgeschnitten und unter dem Binokular geprüft, ob nicht doch auch Antheridien vorhanden waren. In einigen Tropfen sterilen Leitungswassers wurden nun den „Weibchen“ mehrere Antheridien-tragende Prothallienstücke des Vaters zugesetzt und 3 Tage lang zusammengelassen. Dann wurden die Archegonien-tragenden Stücke wieder auf Agar verpflanzt, und nach etwa 10—15 Tagen konnte die beginnende Sporophytenentwicklung beobachtet werden. Die Sporophyten wurden später in Erdtöpfen weitergezogen. Neben Kreuzungen wurden auch Selbstungen durchgeführt. Die Abweicher wurden in der früheren Arbeit nach ihrer Ähnlichkeit in Typen zusammengefaßt. Um unnötige Wiederholungen zu vermeiden, muß wegen der Typenbezeichnungen 01, 02 . . . 19, 20 auf die frühere Arbeit verwiesen werden. Sporophyten wurden beobachtet aus folgenden Kreuzungen:

Normal (00) mit den Typen 01 (♀, ♂), 09 (♂), 12 (♂), 13 (♀, ♂), 15 (nur als ♂ möglich, bildet keine Archegonien), 16 (♀, ♂), 17 (♂), 19 (♀, ♂).

01 als ♀ mit Typ 15, 16, 19, 20 als ♂.

12 als ♀ × 01 als ♂ und 16 als ♀ × 07 als ♂.

Selbstungssporophyten wurden beobachtet von den Typen 01, 05, 09, 12, 16, 17, 19, 20 von *Polypodium aureum* und Typ 16 von *Phyllitis scolopendrium*.

Alle Kreuzungssporophyten, gleichgültig ob der abweichende Typ als ♂ oder ♀ diente, zeigten ganz normale Plastiden, während bei den Selbstungssporophyten der im Prothallium beobachtete Plastidentyp auch im Sporophyten zu erkennen war. Besonders auffällig waren die Selbstungssporophyten der Typen 16 und 17, die schon bei oberflächlicher Inspektion in allen Zellen strenge Ballung der Plastiden zeigten. Selbstungsnachkommen aus Sporenaussaaten wurden beobachtet

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Tabelle 1

Kreuzung	Abweichen- der Typ 01	Normal 00	n
normal × IV 0106	135	140	275
IV 01-b × normal	96	92	188
normal × IV 0105	419	386	805
V 0117 × normal	152	162	314
V 0175 × normal	130	166	296
V 0153 × normal	37	28	65
V 0156 × normal	87	89	176
	Abweichen- der Typ 13	Normal 00	
normal × IV 1303	95	83	178
normal × IV 1304	86	85	171
normal × IV 1309	145	196	341
			$P=0,006$
normal × IV 1318	143	119	262
normal × IV 1322	55	61	116
	Abweichen- der Typ 19	Normal 00	
normal × IV 1903	153	161	314
	Abweichen- der Typ 15	Normal 00	
normal × IV 1502	199	203	402

IV 1304 usw. unabhängig voneinander entstandene Mutanten, die wegen der Ähnlichkeit ihres Phäns zum Typ 01 bzw. 13 zusammengefaßt wurden.

Die Übereinstimmung mit der Erwartung 1:1 ist so gut, daß der P -Wert nur für die eine etwas abweichende Aufspaltung 145:196 angegeben ist.

Die einzige dihybride Kreuzung, die analysiert werden konnte, ist die folgende, wobei die Rekombinationstypen normal (00) und „15 + 01“ (Zellen gedreht, mit großen Plastiden, die die Zellen dicht erfüllen) sind.

Kreuzung	Normal 00	Abweichender Typ 01	Abweichender Typ 15	Abweichender Typ „15 + 01“	n
V 0111 × IV 1503	81	74	65	63	283

Für einige der in der früheren Arbeit beschriebenen Plastidenabweichungen ist ihre karyotische Bedingtheit nachgewiesen, für die nicht untersuchten Fälle kann sie aus den eingangs erwähnten Gründen so gut wie sicher angenommen werden. Die Auffassung von KNUDSON 1940, die von ihm beobachteten Abweichungen der Plastiden bei *Polypodium aureum* beruhten auf Plastomänderungen, ist unhaltbar.

Literatur

KNUDSON, L.: Permanent changes of chloroplasts induced by X-rays in the gametophyte of *Polypodium aureum*. Bot. Gaz. **101**, 721 (1940). — MALY, R.: Zytemorphologische Studien an strahleninduzierten, konstant abweichenden Plastidenformen bei Farnprothallien. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 447 (1951).

Dr. ROLAND MALY, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen a. N., Corrensstr. 41

an vier verschiedenen Abweichern vom Typ 01 und je einem von den Typen 13 und 05 und 16 bei *Phyllitis scolopendrium*.

An dem Material hätte sich eine Reihe interessanter Fragen bearbeiten lassen. Die große Enttäuschung war aber die unerträgliche Generationsdauer. Dem Autor möge es nachgesehen werden, daß er nach 9 Jahren die Sporophyten, die noch immer keine Sporophylle entwickelten, schließlich entfernte und auch die Klonkulturen der Abweicher in den Petrischalen aufgab.

Nach Aussaat der Sporen von den Bastardsporophyten wurden im einzelnen folgende Verhältnisse von Prothallien mit abweichenden und normalen Plastiden festgestellt.

In der Tabelle 1 sind IV 0106, IV 01—b, IV 0105 bzw. IV 1303,

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

GENE FÜR BLÜTEN- UND POLLENFÄRBUNG BEI *PETUNIA**

Von

GISELA MOSIG

(Eingegangen am 29. April 1958)

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Selbststerilität bei *Petunia hybrida* war es notwendig, die Kopplungsgruppen dieser Art festzulegen. Bisher sind jedoch nur wenige Gene von *Petunia* beschrieben. Die Blütenfarben schienen für Genanalysen besonders geeignet. In der F_2 mußte allerdings der Phänotyp jeder Einzelpflanze mit Hilfe der Papierchromatographie bestimmt werden, weil sich die Farbtypen sonst nicht klassifizieren ließen. Bei der Auswertung der Spaltungszahlen konnten bisher 14 Blütenfarbgene analysiert werden, die in der folgenden Tabelle in 3 Gruppen zusammengefaßt sind.

Tabelle 1. Faktoren für die Ausbildung

1. der großen Pigmentklassen			2. von Farbstoffgruppen innerhalb der Klassen			3. von Einzelpigmenten innerhalb der Gruppen	
Gen	Wirkung	Spaltung	Gen	Farbe der Pigmente	Spaltung	Gen	Spaltung
A	Anthocyanbildung	849:298 (= 3:1)	C	dunkelrot	120:46 (= 3:1)		
			D	blaurot	99:39 (= 3:1)		
			E und F	hellrot	56:44 (= 9:7)		
			G und H	dunkelkarmin	305:22 (= 15:1)	K	300:104 (= 3:1)
					157:56 (= 3:1)	L und M	344:22 (= 15:1)
			ii	dunkelkarmin + rot ¹	23:96 (= 1:3)	N	87:32 (= 3:1)
B	Anthoxanthinbildung	1386:488 (= 3:1)	J	creme	456:157 (= 3:1)		

¹ ii kann sich nur in Gegenwart von G und (oder) H manifestieren. GHI = dunkelkarmin.

Zur ersten Gruppe gehören die dominanten Gene für Anthocyan- und Anthoxanthinbildung. Von den 298 *aa*-Pflanzen bilden 174 überhaupt kein Anthocyan, 124 schwache Spuren in den Adern der Petalen. Die *bb*-Pflanzen bilden in ihren Blütenblättern geringe Mengen von Anthoxanthinen, die in allen untersuchten Pflanzen zu finden waren und keinen sichtbaren Einfluß auf die Blütenfärbung hatten. Die Gene A und B wirken und spalten in 2 Familien unabhängig voneinander 9:3:3:1 (332:118:125:28). Die AB-Individuen aus Kreuzungen antho-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

cyanhaltiger, anthoxanthinfreier (roter) mit anthocyanfreien, anthoxanthinhaltigen (cremefarbigen) Pflanzen bilden die Pigmente beider Elternklassen. Dabei verändert das Anthoxanthin als Co-Pigment den Farbton anthocyanhaltiger Blüten. Für die Diskussion der Anthocyansynthese ist es von Bedeutung, daß bei *Petunia* Anthocyane und die Anthoxanthine, die Cremefärbung bzw. Co-Pigmentierung hervorrufen, wahrscheinlich in parallelen Reaktionsschritten gebildet werden, da unabhängige Wirkung nur von Genen zu erwarten ist, die verschiedene Biosyntheseketten steuern.

Die Gene der zweiten Gruppe können sich nur manifestieren, wenn der Faktor *A* bzw. *B* dominant vorhanden ist. Sie kontrollieren die Synthese von Pigmentgruppen verschiedener Farbtöne und wirken teils abhängig, teils unabhängig voneinander. Zahl und Art der Farbstoffe, die zu einer Pigmentgruppe gehören, können unter dem Einfluß der Gene der dritten Gruppe (Faktoren für Einzelpigmente) in den verschiedenen Pflanzen einer Nachkommenschaft variieren.

Außer den Blüten- wurden Pollenfarbgene analysiert. Weiße Pollenfarbe ist dominant über gelbe. Sechs Familien spalten hinsichtlich weißer und gelber Pollen 3:1 (771:266), 2 Familien unter dem Einfluß zweier komplementärer Faktoren (*O*, *P*) 9:7 (107:76). *o* oder *p* ist mit *i* gekoppelt. Durch die Komplementärwirkung zweier dominanter Gene (*Q*, *R*) wird in den F_1 -Pflanzen von 4 Kreuzungen zwischen Eltern mit weißem Pollen blauer Pollen gebildet. Die F_2 spaltet 9:7 (415:327). Die F_2 der Kreuzung einer *QR*-Pflanze mit einer solchen, die zwar weißen Pollen bildet, aber *Q* oder *R* enthält, spaltet erwartungsgemäß 3:1 (215:70). In einer Kreuzung mendeln die Gene für blaue und für gelbe Pollenfarbe unabhängig, in zwei anderen ist *q* oder *r* mit einem Gen für eine gelbe Pollenfarbe gekoppelt. Wenn in einer Pflanze die Faktoren für blauen und für gelben Pollen zusammenwirken, wird grüner Pollen gebildet.

GISELA MOSIG, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität Köln

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GONENKONKURRENZ
IN DER SAMENANLAGE BEI *OENOTHERA* UNTER VERWENDUNG
DER LETALFAKTOREN ALS MARKIERUNGSGENE

I. Mitteilung

DIE INDIVIDUELLE KOMPONENTE DER VARIABILITÄT*

Von

CORNELIA HARTE

(Eingegangen am 23. April 1958)

A. Einleitung

I. Definition

Die Gonenkonkurrenz ist eine bei vielen Objekten bekannte Erscheinung. Mit diesem Ausdruck wird der Tatbestand umschrieben, daß die 4 Gonen, die aus einer Meiosis entstehen, nicht die gleiche Wahrscheinlichkeit besitzen, Gameten zu bilden und zur Befruchtung zu gelangen, und daß diese Bevorzugung oder Benachteiligung bestimmter Gonen ihre Ursache in der genetischen Konstitution der betreffenden Zellen hat. CORRENS beschrieb die Certation (1917, 1918, 1921, 1924) an Pollenschläuchen von *Melandrium*, und von RENNER wurden 1921 zuerst entsprechende Beobachtungen an Eizellen von *Oenothera* gemacht. Die weiteren Untersuchungen an diesem Objekt wurden von HARTE (1948, 1953) zusammengefaßt. Bei der Gonenkonkurrenz im ♂ Geschlecht entwickeln sich zunächst alle Gonen zu Pollenkörnern, und die Konkurrenz tritt erst beim Pollenschlauchwachstum und der Befruchtung zutage. Es kann dabei nicht ohne weiteres festgestellt werden, ob es sich um eine echte Benachteiligung von Gonen eines bestimmten Genotyps durch Konkurrenz um die Nährstoffe in der Anthere handelt, die dann sekundär das Wachstum der haploiden Generation bestimmen, oder um eine Konkurrenz zwischen den Haplonten (Pollenschläuchen) (HARTE 1952). Für die Samenanlagen wurde dagegen von RENNER angenommen, daß eine echte Gonenkonkurrenz vorliegt.

II. Entwicklungsgeschichtliche Grundlagen

Bei den homozygoten *Oenothera*-Arten entwickelt sich in der Samenanlage diejenige Gone zum Embryosack, die in der linear angeordneten Tetrade der Mikropyle am nächsten liegt. Dasselbe gilt für die komplexheterozygoten Arten, bei denen beide Komplexe in den Eizellen in gleicher Häufigkeit vorliegen. Die *Oe. Lamarckiana* kommt diesem Idealfall am nächsten. Bei den meisten heterogamen *Oenothera*-Arten kommt dagegen in den Eizellen fast ausschließlich der eine Komplex vor, der häufig einen Polleninaktivierungsfaktor enthält und somit nur im ♀ Geschlecht aktiv wird (Eizellenkomplex), während der andere Komplex fast ausschließlich durch den Pollen vererbt wird und nur in seltenen Ausnahmefällen in die Eizelle gelangt (Pollenkomples).

* O. RENNER zum 75. Geburtstag gewidmet.

Die histologischen Untersuchungen von RENNER an sich entwickelnden Samenanlagen zeigten, daß bei den Arten mit genetisch uniformen Eizellen in etwa der Hälfte der Samenanlagen sich nicht die durch ihre Lage an der Mikropyle vorbestimmte Gone zum Embryosack entwickelt, sondern daß dieser aus einer der beiden letzten Zellen der Viererreihe hervorgeht. Wenn in der Meiosis keine polare Anordnung der beiden Chromosomenkomplexe während der Metaphase erfolgt, ist zu erwarten, daß jeder Komplex die gleiche Wahrscheinlichkeit besitzt, in das mikropylare Ende der Tetrade zu gelangen. Wenn diese Gone sich immer zum Embryosack entwickelt, müssen demnach die beiden Komplexe je in der Hälfte der Samenanlagen enthalten sein. Die beschriebene Erscheinung des konkurrierenden Wachstums zweier Gonen bei heterogamen Arten besagt, daß die mikropylare Gone nur dann zur Entwicklung gelangt, wenn sie den Komplex enthält, der die stärkere Wachstumstendenz aufweist und so, gefördert durch seine bevorzugte Lage, zur Bildung des Embryosacks schreitet. Ist dagegen der genetisch bevorzugte Komplex in die der Mikropyle abgewandte Seite der Tetrade gelangt, so kann er trotz dieser Benachteiligung durch die Lage seine Tendenz zur Bildung des Embryosacks durchsetzen gegenüber der mikropylaren Gone, die durch ihre Lage bevorzugt, durch die genetische Konstitution des in ihr enthaltenen Komplexes aber benachteiligt ist. Der genetische Vorteil des einen Komplexes gegenüber dem anderen muß also so groß sein, daß er gegenüber dem lagemäßigen Vorteil überwiegt. Je nach dem Ausmaß, in dem diese Verdrängung eines Typs von Gonen erfolgt, finden sich in den Samenanlagen der betreffenden Sorte mehr oder weniger oft Eizellen mit dem Pollenkomplex. Anscheinend sind alle Übergänge möglich von nur geringer Verschiebung des Verhältnisses 1:1 an. Eine völlige Ausschaltung scheint nicht vorzukommen. Es gibt aber Arten, bei denen die Häufigkeit von Eizellen mit dem Pollenkomplex weit unter 1 % liegt.

III. Problemstellung

Die nächste Untersuchung des Problems durch RENNER (1940) zeigte an diplarrhenen Bastarden, in denen 2 Pollenkomplexe vereinigt sind, durch Befruchtung einer der seltenen Eizellen mit einem Pollenkomplex mit dem Pollen einer anderen heterogamen Art, daß hier nicht alle Samenanlagen funktionsfähige Eizellen haben, sondern daß in vielen Fällen die Anlagen degenerieren weil anscheinend keine der Gonen zur Bildung des Embryosacks befähigt ist. Danach sieht es so aus, als ob nicht die Eizellenkomplexe der Ausgangsarten eine besondere Befähigung zur Bildung des Embryosacks aufweisen, die es ihnen ermöglicht, Gonen mit dem anderen Komplex zu verdrängen, sondern daß diese Fähigkeit den Pollenkomplexen der heterogamen Arten abgeht, so daß sie auch ohne Konkurrenz nicht zur Bildung des Embryosacks schreiten. Wenn dies in vollem Umfang zutreffen würde, läge keine echte Gonenkonkurrenz vor, sondern die anscheinend in der Konkurrenz überlegenen Gonen bestimmter genetischer Konstitution würden nur deshalb die Eizelle bilden, weil der Platz durch die Unfähigkeit der „richtig“ liegenden Gone frei geworden wäre. In diesem Falle müßte die Durchschlagskraft eines Eizellenkomplexes völlig abhängen von dem Pollenkomplex, mit dem er jeweils kombiniert ist, und das Auftreten eines Pollenkomplexes in der Eizelle müßte unabhängig vom Partner in immer der gleichen

Häufigkeit erfolgen. Die Untersuchungen von HARTE (1953) an *Oenothera*-komplexen, die in verschiedener Weise genetisch markiert waren, gab jedoch Anhaltspunkte für die Annahme, daß die Konkurrenzfähigkeit eines Komplexes keine unabänderliche Größe sei, sondern wesentlich vom jeweiligen Partner abhängt.

IV. Genetische Grundlagen

Für genauere Feststellungen hierüber mußte aber eine Methode gefunden werden, mit Hilfe eines einfachen Testes das Auftreten eines bestimmten Komplexes in der Eizelle festzustellen, um die Untersuchung eines großen Materials zu gestatten, in dem jeder Komplex mit möglichst vielen anderen kombiniert werden kann. Die Möglichkeit hierzu ist gegeben durch eine genetische Markierung der Komplexe mit einzelnen Genen, deren crossing-over-Häufigkeit gegen den Komplex praktisch gleich Null ist und deren Auswirkungen phänotypisch leicht erkannt werden können. Dabei sind die Faktoren am besten geeignet, die am frühesten eine Erkennung der Genotypen gestatten, weil hierdurch die Untersuchungsarbeit verringert werden kann. Unter den genetischen Faktoren, die bei *Oenothera* bisher bekannt sind, sind die Letalfaktoren diejenigen, die dieser Forderung am besten entsprechen. Wie bereits lange bekannt ist (RENNER 1917, 1933), besitzen die meisten Komplexe der heterozygoten Arten solche Letalfaktoren, durch deren Wirkung die homozygoten Embryonen auf sehr frühen Entwicklungsstadien stehenbleiben und später degenerieren. Die Samenschale entwickelt sich nach dem Befruchtungsreiz in normaler Weise weiter, so daß bei der Reife die leeren „tauben“ Samen äußerlich nicht von solchen mit normalen Embryonen zu unterscheiden sind (RENNER 1921). Durch Öffnen der Samenschale kann aber leicht festgestellt werden, ob darin ein Keimling enthalten ist oder ob Reste von Endosperm und degeneriertem Embryo vorzufinden sind.

Da bei den heterogamen Arten der Eizellenkomplex nicht im Pollen aktiv wird, ist der zur Befruchtung gelangende Pollen einer solchen Art immer genetisch einförmig. Wenn er mit einem Letalfaktor versehen ist, werden sich nach Selbstbestäubung 2 Sorten von Embryonen bilden. Diejenigen, die aus der Befruchtung einer Eizelle, die den „Eizellenkomplex“ enthält, hervorgehen, müssen normale Keimlinge entstehen lassen. Die Eizellen aber, die ausnahmsweise den Pollenkomplex und damit dessen Letalfaktor enthalten, werden nach Befruchtung durch einen Pollenschlauch, der den gleichen Komplex in seinen Kernen mitbringt, zu absterbenden Embryonen in tauben Samen führen. Der Anteil der tauben Samen, der nach Selbstung einer heterogamen Form entsteht, ist also ein exaktes Maß dafür, in welcher relativen Häufigkeit der Pollenkomplex in der Eizelle auftritt.

V. Versuchsplan

Auf diesen Grundlagen wurde folgender Versuchsplan ausgearbeitet. Wenn der gleiche Eizellenkomplex mit verschiedenartigen Pollenkomplexen kombiniert wird, ergibt sich aus den Unterschieden im Auftreten der tauben Samen, welchen Einfluß der Pollenkomplex auf das Konkurrenzvermögen des geprüften Eizellenkomplexes hat. Ebenso ist bei Kombination des gleichen Pollenkomplexes mit verschiedenen Eizellenkomplexen zu ersehen, ob wirklich die mangelnde Eignung des Pollenkomplexes, die nur von diesem bestimmt und daher immer

gleich sein sollte, ein Fehlen in den Eizellen bestimmt oder ob sein Auftreten vom Partnerkomplex beeinflusst wird. Die beschriebene Versuchsanordnung ermöglicht also Feststellungen darüber, ob eine echte Gonenkonkurrenz in der Samenanlage gegeben ist oder ob die andere Alternative, nämlich nur mangelnde Eignung des Pollenkomplexes als einzige Ursache für ihr Fehlen in den Eizellen, anzunehmen ist.

Bei genügendem Umfang des Materials, der durch die einfache Bestimmung der tauben Samen leicht erreicht werden kann, läßt sich zugleich noch ein anderer Gesichtspunkt in die Untersuchung einbeziehen. Bisher wurde immer angenommen, daß die Gonenkonkurrenz ausschließlich durch die genetische Konstitution der zueinander in Beziehung tretenden Gonen bestimmt sei. Es fragt sich aber, ob dies wirklich der Fall ist oder ob nicht vielmehr der Entwicklungsprozeß, der beim konkurrierenden Wachstum der Gonen abläuft, ebenso wie andere Entwicklungsvorgänge durch Umwelteinflüsse verändert werden kann. Das Ausmaß der Konkurrenz oder das Durchsetzungsvermögen eines Komplexes gegenüber einem bestimmten anderen Partner wäre dann nicht konstant, sondern müßte eine Variabilität zeigen, die über das Maß dessen hinausgeht, was als Zufallsvariation möglich ist. Wenn also die Untersuchung nicht auf nur eine Bestimmung für jede Komplexkombination beschränkt wird, sondern eine größere Anzahl von Pflanzen und die Samenanlagen aus mehreren Fruchtknoten jeder Pflanze zur Untersuchung kommen, unter Umständen noch kombiniert mit verschiedenartigen Außenbedingungen, müssen sich auch für diesen Punkt Hinweise finden lassen.

B. Material und Methode

Als Ausgangsformen für die Untersuchungen fanden 14 komplexheterozygotische Arten und Rassen von *Oenothera* Verwendung. Diese wurden geselbstet und reziprok miteinander gekreuzt. Es ergaben sich so die Komplexkombinationen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Von allen Formen wurden möglichst vom Beginn der Blütezeit an bei mehreren Pflanzen eine größere Anzahl von übereinanderstehenden Blüten geselbstet und die Früchte nach der Samenreife geerntet. Die reifen Samen wurden in Petrischalen auf feuchtem Fließpapier ausgelegt. Nach dem Quellen wurden je 100 Samen aus jeder Kapsel geöffnet, um festzustellen, ob ein ausgebildeter Embryo darin enthalten war. Für diese Prüfung wurden nur gut ausgebildete Samen aus großen Kapseln verwendet. Eindeutig verkümmerte Samen und Samen aus kümmerlichen Früchten wurden verworfen, um den Einfluß einer wechselnden Häufigkeit unbefruchteter Samenanlagen und von unkontrollierbaren Entwicklungsstörungen der jungen Samen auszuschalten. Die Berechtigung dieses Vorgehens ergibt sich aus den Befunden von RENNER (1916, 1918) über die Entwicklung der Samen bei *Oenothera*-Arten der Untergattung *Euoenothera*, zu der alle Ausgangsarten gehören.

Die für die Auswertung herangezogenen statistischen Methoden werden jeweils bei den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Die Arten, von denen die Kreuzungen ausgingen, stammten aus den Kulturen von Herrn Professor Dr. F. OEHLKERS (Bot. Institut, Universität Freiburg), die *Oe. suaveolens* GRADO von Herrn Dr. W. STUBBE (Bot. Institut, Universität Köln). Die technischen Assistentinnen Fräulein I. PETRI und Fräulein H. GRÜTZMACHER halfen bei den Versuchen und den statistischen Berechnungen. Die Daten für die Varianzanalysen wurden zum großen Teil mit Hilfe der elektronischen Rechenmaschine IBM 650 gewonnen (Gerät der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Institut für Praktische Mathematik, Technische Hochschule Darmstadt, Prof. Dr. A. WALTER). Die Programmierung und Berechnung wurde von Herrn Dr. P. IHM (Arbeitsgemeinschaft für Biometrie, Freiburg i. Br.) übernommen. Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Allen hier Genannten möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Arten und Bastarde von *Oenothera*

Zeichenerklärung: a = verwendet in Abschnitt I (Untersuchung ganzer Infloreszenzen); b = verwendet in Abschnitt II (Untersuchung der Variabilität zwischen den Pflanzen einer Sorte, vollständige Auswertung); c = verwendet in Abschnitt II (Untersuchung der Variabilität zwischen den Pflanzen einer Sorte, unvollständige Daten)

Art	♀	biennis München	biennis Hannover	biennis A ₂ a	biennis apetala cruciat	biennis apetala erweitert	suaveolens sulfurea	suaveolens sulfurea	suaveolens gelb	suaveolens gelb	suaveolens Grado	suaveolens Grado	strigosa	Cockerelli	chicaginisensis	muricata	atrovirens
♂	Komplexe	b ₁ albicans M	b ₁ albicans H	b ₁ albicans A ₂ a	b ₁ albicans cr ₁	b ₁ albicans cr ₂	s ₁ albicans	flavens-s	s ₁ albicans	flavens + s	s ₁ albicans Grado	flavens Grado	deprimens	curtans	excellens	rigens	pingens
biennis M	rubens M	ab	b	ab	ab	ab	ab	c	ab	c				ab	ab		
biennis H	rubens H	ab	ab	ab	ab	ab	ab	c	ab	bc				ab	ab		
biennis A ₂ a	rubens A ₂ a	ab	b		ab	ab				c				ab	ab		
biennis apetala cruciat	rubens-cr ₁	ab	ab	ab	ab	ab	ab	c	b	c				a	ab		
biennis apetala erweitert	rubens-cr ₂	ab	b	b	ab	ab		c		c				b	b		
suaveolens sulfurea	flavens-s	ab	ab	ab	ab	abc	b		ab				b	ab	ab		
suaveolens gelb	flavens + s	ab	b	ab	ab	ab			b					a	ab		
suaveolens Grado	flavens	b	b		b	b	b				b				c		
strigosa	stringens	ab		ab	ab	ab	ac	bc	ac	b			b	ab	ab		
Cockerelli	elongans	abc	ab	ab	ab	abc	bc	bc	bc	b			b	ab	ab	b	
chicaginisensis	punctulans	abc	b	ab	ab	c	c	c	bc				ab	ab			b
muricata	curvans	ab	ac	b	ab	b	c										

C. Ergebnisse der Untersuchungen

I. Variabilität zwischen den Kapseln innerhalb einer Infloreszenz

a) Befunde. Die erste Prüfung muß sich damit befassen, die Variabilität des interessierenden Merkmals, also der Häufigkeit der tauben Samen, zwischen den Kapseln einer Pflanze zu erfassen, um Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, inwieweit aus der Untersuchung einer Kapsel bereits Rückschlüsse auf das Verhalten der ganzen Pflanze gezogen werden können und wie groß das Material für zuverlässige Schlußfolgerungen sein muß. Zu diesem Zweck wurden von 65 Kombinationen, die aus Tabelle 2 zu entnehmen sind, an insgesamt 116 Pflanzen (1—4 Pflanzen je Sorte) alle Blüten der Infloreszenz geselbstet und dann aus jeder zweiten Kapsel der Anteil der tauben Samen bestimmt. Je nach der Größe der Infloreszenz ergaben sich Werte für 10—64 Kapseln, im Mittel 28,4 Kapseln je Pflanze.

Für die Prüfung wurde die Varianzanalyse verwendet, wobei von folgender Überlegung ausgegangen wurde. Die Beobachtungswerte werden als Prozentzahlen gewonnen aus Proben konstanten Umfangs (100 Samen). Die einzelnen Werte haben dann eine unterschiedliche

Tabelle 2. Übersicht über die Ergebnisse der

Für jede Komplexkombination ist von jeder in Abschnitt I verwendeten Pflanze angegeben: a = Mittelwert der tauben Samen in % für die ganze Infloreszenz; b = Anzahl der untersuchten Kapseln; c = Homogenität der Werte für die verschiedenen Kapseln der Infloreszenz (h = homogen, i = inhomogen ohne erkennbare Richtung; + = positive Regres-

Art ♀		biennis München			biennis Hannover			biennis A ₂ a			biennis apetala cruciat		
♂ Komplex		b _{albicans} M			b _{albicans} H			b _{albicans} A			b _{albicans} cr ₁		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
biennis München	rubens M	3,6 3,1	32 51	i— i				6,3 9,2	37 54	h ix	6,3	32	h
biennis Hannover	rubens H	7,9 9,6	33 52	i+ ix	4,0 4,6	27 34	h h	9,1 10,8	49 64	i— ix	5,4 10,3	33 52	h ix
biennis A ₂ a	rubens A	20,9 5,0	32 24	i+ i							8,6 19,6	30 37	i i
biennis apetala cruciat	rubens-cr ₁	3,7 6,1	32 50	i i	4,8	14	h	7,1 5,9 6,4	39 51 21	i ix i	4,6 3,1 4,9 3,5	31 42 46 53	h h i i
biennis apetala erweitert	rubens-cr ₂	5,2 5,2	29 31	i i							8,1 9,1 7,4 5,7	17 44 45 53	i i i hx
suaveolens sulfurea	flavens-s	68,5	23	h	67,4	14	i+	58,5 61,0 57,3	24 26 27	h i i	63,1 62,1	14 19	i i
suaveolens gelb	flavens+s	59,0 54,6	23 24	i+ i				53,6	25	i	63,8 67,4	13 14	h +
strigosa	stringens	13,8 6,2	30 34	i+ h				5,0	11	h	4,9	28	h
Cockerelli	elongans				8,6	23	h	65,7 58,7 66,2	19 33 36	h i i	64,3 68,9	13 23	+ i
chicaginensis	punctulans				5,1	27	h						
muricata	curvans	12,5 7,3	24 28	i h	7,3	28	i				7,9 7,9	14 21	i h

Varianz, die von der Größe der betreffenden Prozentzahl abhängt. Nach einer Winkeltransformation (FISHER u. YATES 1948) haben alle Einzelwerte die gleiche Varianz, die ihre theoretische Verteilung um das gemeinsame Mittel beschreibt. Bei einem Probenumfang von $n=100$ ist $V_\phi = 8,21$. Andererseits kann aus den Beobachtungswerten die empirische Varianz des gegebenen Materials bestimmt werden, die als Schätzwert der theoretischen Varianz nur zufällig davon differieren dürfte, wenn die einzelnen Kapseln Stichproben aus einem einheitlichen Material darstellen. Das Varianzverhältnis $F = V:V_\phi$ gibt unter Berücksichtigung der für beide Werte zur Verfügung stehenden Anzahl der Freiheitsgrade ein Maß für die Abweichung der empirischen Streuung von der Erwartung V_ϕ . Als Grenzwert für

Auszahlungen an ganzen Infloreszenzen

sion; — = negative Regression; i + = Regression positiv, aber mit übernormaler Streuung der Werte um die Regressionslinie; i — = ebenso, aber Regression negativ). x = diese Pflanzen wurden auch in Abschnitt

III (Tabelle 9) verwendet

biennis apetala erweitert			suaveolens sulfurea			suaveolens gelb			strigosa			Cockerelli			chicaginisensis		
b _{albicans} cr ₃			s _{albicans}			s _{albicans}			deprimens			curtans			excellens		
a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
4,8	30	i	5,5	26	h	2,9	18	h				13,3	31	h	31,7	24	i +
3,4	37	h	3,9	28	h	2,8	24	i									
13,8	38	i															
7,9	40	i —	5,1	25	i —	5,5	23	h				12,5	31	i	37,1	30	i —
			4,6	37	i —	4,1	28	—									
23,9	29	i										9,5	40	i +	19,8	33	i
6,5	33	i															
13,1	34	i —															
7,9	50	i	3,8	21	i							8,5	27	i —	54,4	44	i
7,6	42	i —	4,5	26	i												
			4,0	39	i												
5,3	23	i															
3,8	25	i															
6,2	30	h															
70,1	14	i				93,3	14	h				62,8	16	i	56,7	33	i +
66,5	21	i +				93,9	21	h									
65,3	17	h										66,4	18	i +	62,0	31	i +
58,4	17	i															
62,7	22	i															
4,1	20	h	5,5	11	h	5,0	12	h				17,0	22	i —	17,7	36	i +
3,7	32	h	5,1	14	h	5,4	14	h				27,7	37	i —			
			5,7	15	h												
67,5	13	h													68,6	47	i +
66,9	14	h															
65,2	16	h															
65,3	19	h															
21,4	10	i							77,1	31	i	73,5	21	h			
49,2	17	i										71,4	26	i			
46,9	26	h															
43,0	29	h															

die Homogenität wurde $P=0,01$ gewählt, weil bei dem großen Umfang des Materials die hierdurch größere Wahrscheinlichkeit für das Auffinden stärkerer Zufallsschwankungen berücksichtigt werden muß. Bei den Pflanzen, die eine Inhomogenität erkennen ließen, erfolgte eine weitere Untersuchung mit Hilfe der varianzanalytischen Bearbeitung der Regression (MATHER 1948).

Die Unterschiede zwischen den Kapseln einer Pflanze sind fast durchweg größer als die Differenzen, die bei nur zufälliger Variation erwartet werden können. Nur bei 44 von den 124 Pflanzen ist der Anteil der tauben Samen je

Tabelle 3. *Beispiele für die Variabilität innerhalb einer Pflanze (Umfang jeder Probe $n = 100$)*

Sorte	Komplexe	Prozent tauber Samen in übereinanderstehenden Kapseln																in-homogen	keine Regression					
biennis apetal _a erweitert × chicagimensis	balbicans-cr ₂ · punctulans	15	17	12	23	26	32	35	33	17	20	8	9	18	16	29	homogen	keine Regression						
biennis apetal _a erweitert × Cockerelli	balbicans-cr ₂ · elongans	60	62	49	60	67	72	69	74	63	62	69	73	64	66	65	68	homogen	keine Regression					
biennis A ₂ a × strigosa	balbicans A ₂ a · stringens	5	3	2	6	5	8	5	3	5	6	7					homogen	keine Regression						
biennis Hannover × suaveolens sulfurea	balbicans H · flavens	63	65	56	54	66	57	59	75	56	72	70	77	80	94		Streuung normal	Regression positiv						
Cockerelli × strigosa	curtans · stringens	31	11	39	39	97	80	11	18	9	6	2	3	4	4	5	2	2	3	1	5	1	Streuung über-normal	Regression negativ mit 2 sprunghaften Änderungen

Kapsel in der ganzen Infloreszenz homogen. In diesen Fällen liegen aber eine Anzahl P-Werte ziemlich niedrig, so bei 9 Pflanzen zwischen 0,05 und 0,01 und bei 11 Pflanzen zwischen 0,2 und 0,05, zusammen 47,7% von 44 Pflanzen, während in diesen Gruppen nur 4%, bzw. 15% aller Werte erwartet werden. Die Übereinstimmung zwischen den Kapseln einer Infloreszenz ist also auch hier nicht besonders gut.

Bei den übrigen 80 Pflanzen sind die Differenzen zwischen den Kapseln einer Infloreszenz so groß, daß sie nicht mehr als zufällig angesehen werden können. Die Anordnung der variierenden Kapseln zeigt keine Gesetzmäßigkeiten. In der Mehrzahl (53 Pflanzen) sind hohe und niedrige Werte über die ganze Infloreszenz verteilt. Es ist aber meist zu erkennen, daß für benachbarte Kapseln die Werte sehr eng zusammenliegen oder über kürzere Strecken hin eine an- oder absteigende Tendenz vorliegt, die dann umschlägt. Ein solcher Wechsel kann ein- oder mehrmals in der Infloreszenz auftreten. Bei einigen Pflanzen findet sich eine bestimmte Richtung der Veränderungen, indem von der ersten zur letzten Kapsel die Häufigkeit der tauben Samen zunimmt (positive Regression, 15 Pflanzen) oder abnimmt (negative Regression, 12 Pflanzen), aber auch hier liegt nur in wenigen Fällen eine lineare Regression vor. Bei 24 Pflanzen dieser Gruppe ist die Streuung um die Regressionslinie stärker, als zufällig möglich ist.

In Tabelle 3 sind 5 Beispiele für die Variabilität innerhalb der Infloreszenzen zusammengestellt, und zwar für positive und negative Regression, Inhomogenität ohne erkennbare Richtung und Homogenität der Werte. Um die Tabelle nicht zu umfangreich werden zu lassen, wurden Pflanzen mit relativ wenigen Kapseln gewählt. Die Verhältnisse bei den größeren Infloreszenzen unterscheiden sich jedoch nicht davon.

In Tabelle 4 sind für 44 dieser Pflanzen die Endanalysen und andere statistische Daten gegeben. Es wurden neben einigen anderen hierfür vor allem diejenigen ausgewählt, bei denen auf Grund der Verteilung der %-Werte ein gesetzmäßiger An- oder Abstieg in der Infloreszenz für möglich gehalten wurde. Die entsprechenden, weniger instruktiven Angaben für die übrigen Pflanzen wurden aus Gründen der Platzersparnis weggelassen. Die Spalte N enthält die Gesamtzahl der für diese Pflanze untersuchten Kapseln, M ist der Mittelwert in Prozent tauber Samen, die Spalte „Extremwerte“ gibt den höchsten und niedrigsten Wert dieser Infloreszenz an. $V_{\text{Regr.}}$ ist die Varianzkomponente, die auf die Regression zurückzuführen ist, V_{Rest} die Varianz, die nach Abzug der Regression übrigbleibt. Die Spalte $F_1 = V_{\text{Regr.}}/V_{\text{Rest}}$ gibt mit dem Varianzverhältnis ein Maß für den relativen Einfluß, den diese beiden Komponenten auf die Variabilität innerhalb dieser Infloreszenz haben. Eine statistische Sicherung mit $P < 0,01$ in dieser Spalte bedeutet, daß eine Regression vorliegt, d. h. daß der gesetzmäßige An- oder Abstieg der Werte für die einzelnen Kapseln in Abhängigkeit von ihrer Stellung an der Infloreszenz gesichert ist. Die letzte Spalte bedarf einer weiteren Erläuterung. Da jede einzelne Probe aus 100 Samen bestand, ist die Varianz der Werte nach Winkeltransformation $V_\phi = \frac{820,7}{100} = 8,21$. Bei nur zufälliger Streuung der

einzelnen Kapseln um den Mittelwert der Infloreszenz oder um die Regressionslinie müßte die empirisch bestimmte Restvarianz diesem Wert entsprechen. Wenn sie gesichert größer ist, gemessen als Varianzverhältnis $F_2 = V_{\text{Rest}}/V_\phi$, so besagt dies, daß die Streuung der Einzelwerte größer ist, als bei dem gegebenen Umfang des Materials zufällig möglich wäre. Es müssen dann, außer der Regression, noch weitere unbekannte Variabilitätskomponenten im Material wirksam sein.

b) Vermutliche Ursachen der Variabilität. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß der Anteil der tauben Samen nicht von vornherein festliegt und nur zufälligen Abweichungen unterliegt. Es muß vielmehr Einflüsse geben, die variierend wirken können.

Die Anzahl der Kapseln je Infloreszenz hat keinen Einfluß auf die Homogenität der Ergebnisse. Die Prüfung der Mittelwerte für die Zahl der untersuchten Kapseln je Pflanze ergab zwar für die Gruppen „inhomogen“ und „homogen“ eine durchschnittliche Anzahl von 31,1 bzw. 24,2 untersuchten Kapseln je Infloreszenz. Die Differenz ist mit $P < 0,001$ gesichert. Die Variationsbreite ist für beide Gruppen ungefähr gleich, nämlich für „inhomogen“ von 10—64, für „homogen“ von 11—53, wobei die niedrigen Klassen in beiden Gruppen fast gleich stark besetzt sind.

Ein Zusammenhang mit dem Mittelwert der Infloreszenz ist ebenfalls nicht zu sehen. Pflanzen mit einem großen durchschnittlichen Anteil an tauben Samen variieren in der gleichen Weise wie solche mit einem niedrigen Mittelwert.

Dies läßt den Schluß zu, daß das Auftreten einer Inhomogenität innerhalb einer Infloreszenz nicht von ihrer Größe abhängt, sondern bereits auf sehr kleinen Strecken möglich ist, aber mit zunehmender Kapselzahl nimmt die Wahrscheinlichkeit dafür zu, eine vorhandene Inhomogenität als solche zu erkennen und vor allem zu sichern. Es müssen also Ursachen vorhanden sein, die den Gehalt an tauben Samen beeinflussen und nicht in der ganzen Infloreszenz gleichartig wirken. Einer dieser Einflüsse muß von der Art sein, daß er nicht direkt auf die Samenanlagen, sondern über die Infloreszenz wirkt, dabei zeitweise konstant ist und sich langsam verändert, während nur sehr selten ein plötzlicher Umschlag erfolgt, der jedoch durchaus möglich ist und einige Male festgestellt wurde. Die Ursache der Veränderung kann nicht an das Abblühen der Infloreszenz gebunden sein, da sie dann immer in der gleichen Richtung wirken müßte. Ein Gradient, der sich mit fortschreitender Entwicklung der Pflanze gesetzmäßig ändern würde, kann also ausgeschlossen werden. Die Differenzen sind auch nicht von Witterungseinflüssen bestimmt, denn dann müßten alle gleichzeitig abgeblühten Pflanzen

Tabelle 4. Statistische Daten für einige der Pflanzen aus Tabelle 2

a = in % tauber Samen je Kapsel; b = Berechnung nach Winkeltransformation der %-Zahlen; c = gesichert mit $P < 0,01$.

$V_{\phi} = 8,21$ für $n = 100$

Sorte	Komplexe	N	M (a)	Extrem- werte	V Regr. (b)	V Rest (b)	F ₁	F ₂
Oenothera biennis München	balbicans M · rubens M	32	3,6	0-18	674,69	41,84	16,13 (c)	5,1 (c)
biennis München × biennis Hannover	balbicans M · rubens H	33	7,9	0-21	539,67	24,75	21,8 (c)	3,0 (c)
biennis München × biennis A _{2a}	balbicans M · rubens A _{2a}	32	20,9	3-64	2244,12	45,09	49,77 (c)	5,5 (c)
biennis München × suaveolens sulfurea	balbicans M · flavens -s	23	68,5	59-75	2,56	5,98	0,43	0,7
biennis München × suaveolens gelb	balbicans M · flavens +s	23	59,0	39-75	340,97	15,48	22,03 (c)	1,9 (c)
biennis München × suaveolens gelb	balbicans M · flavens +s	24	54,6	32-70	180,04	29,45	6,11	3,6 (c)
biennis München × strigosa	balbicans M · stringens	30	13,8	4-43	367,45	41,84	8,78 (c)	5,1 (c)
biennis Hannover × biennis apetala cruciat	balbicans H · rubens-cr ₁	14	4,8	2-9	5,40	9,96	0,54	1,2
biennis Hannover × suaveolens sulfurea	balbicans H · flavens -s	14	67,4	54-94	462,47	27,18	17,02 (c)	3,3 (c)
biennis Hannover × Cockerelli	balbicans H · elongans	23	8,6	3-20	123,80	15,96	7,76	1,9
biennis Hannover × chicaginnensis	balbicans H · punctulans	27	5,1	2-11	1,10	11,34	0,10	1,4
biennis A _{2a} × biennis Hannover	balbicans A _{2a} · rubens H	64	10,8	2-40	82,03	43,25	1,90	5,3 (c)
biennis A _{2a} × biennis Hannover	balbicans A _{2a} · rubens H	40	9,1	2-22	385,37	15,84	24,33 (c)	1,9 (c)
biennis apetala cruciat × biennis apetala erweitert	balbicans-cr ₁ · rubens-cr ₂	17	8,1	2-20	105,36	19,04	5,53	2,3 (c)
biennis apetala cruciat × suaveolens gelb	balbicans-cr ₁ · flavens +s	14	67,4	59-74	50,17	2,54	19,71 (c)	0,3
biennis apetala cruciat × muricata	balbicans-cr ₁ · curvans	14	7,9	2-19	147,47	20,13	7,33	2,5 (c)
biennis apetala cruciat × Cockerelli	balbicans-cr ₁ · elongans	13	64,3	29-72	126,58	9,28	13,64 (c)	1,1
biennis apetala erweitert × biennis Hannover	balbicans-cr ₂ · rubens H	40	7,9	2-20	281,10	17,97	15,64 (c)	2,2 (c)
biennis apetala erweitert × biennis A _{2a}	balbicans-cr ₂ · rubens A _{2a}	34	13,1	0-48	1995,89	41,12	48,54 (c)	5,0 (c)
biennis apetala erweitert × biennis apetala cruciat	balbicans-cr ₂ · rubens-cr ₁	42	7,6	1-23	594,61	35,11	16,93 (c)	4,3 (c)
biennis apetala erweitert × suaveolens sulfurea	balbicans-cr ₂ · flavens -s	21	66,5	53-78	134,69	11,48	11,74 (c)	1,4
biennis apetala erweitert × chicaginnensis	balbicans-cr ₂ · punctulans	26	46,9	27-57	18,29	13,12	1,39	1,6
biennis apetala erweitert × chicaginnensis	balbicans-cr ₂ · punctulans	17	49,2	37-64	21,66	18,61	1,16	2,3 (c)
biennis apetala erweitert × chicaginnensis	balbicans-cr · punctulans	29	43,0	14-55	29,49	11,04	2,67	1,3
suaveolens sulfurea × biennis Hannover	salbicans · rubens H	25	5,1	1-12	251,16	5,17	48,61 (c)	0,6
suaveolens sulfurea × biennis Hannover	salbicans · rubens H	37	4,6	0-16	249,55	16,45	15,17 (c)	2,0 (c)
suaveolens sulfurea × biennis apetala cruciat	salbicans · rubens-cr ₁	26	4,5	0-17	78,96	29,61	2,67	3,6 (c)
suaveolens gelb × biennis Hannover	salbicans · rubens H	28	4,1	0-11	249,82	9,62	25,98 (c)	1,2
Cockerelli × biennis Hannover	curtans · rubens H	31	12,5	3-31	103,03	21,18	4,86	2,6 (c)
Cockerelli × biennis München	curtans · rubens M	31	13,3	4-20	15,97	12,86	1,24	1,6
Cockerelli × biennis A _{2a}	curtans · rubens A _{2a}	40	9,5	1-45	1291,82	41,52	31,11 (c)	5,1 (c)

Cockerelli × biennis apifala cruciat.	27	8,5	1—26	312,59	26,50	11,80 (c)	3,2 (c)
Cockerelli × suaveolens sulfurea	16	62,8	54—74	22,64	17,30	1,31	2,1 (c)
Cockerelli × suaveolens gelb	18	66,4	39—87	566,44	66,29	8,55 (c)	8,1 (c)
Cockerelli × strigosa	22	17,0	1—97	3569,87	213,01	16,76 (c)	25,9 (c)
Cockerelli × strigosa	37	27,7	2—96	11983,43	165,67	72,33 (c)	20,2 (c)
chicagnensis × biennis Hannover	30	37,1	16—67	812,68	55,86	14,55 (c)	6,8 (c)
chicagnensis × biennis München	24	31,7	9—47	455,98	26,49	17,22 (c)	3,2 (c)
chicagnensis × biennis A ₂ ^a	33	19,8	9—37	97,13	21,57	4,50	2,6 (c)
chicagnensis × biennis apifala cruciat	44	54,4	4—99	2150,80	564,60	3,81	68,8 (c)
chicagnensis × suaveolens sulfurea	33	56,7	35—91	803,06	27,87	28,82 (c)	3,4 (c)
chicagnensis × suaveolens gelb	31	62,0	10—98	1039,18	109,42	9,50 (c)	13,3 (c)
chicagnensis × strigosa	36	17,7	3—90	3635,12	215,06	16,90 (c)	26,2 (c)
chicagnensis × Cockerelli	47	68,6	15—97	2758,92	29,52	93,45 (c)	3,6 (c)
curtans · rubens-cr ₁							
curtans · flavens-s							
curtans · flavens + s							
curtans · stringens							
curtans · stringens							
excellens · rubens H							
excellens · rubens M							
excellens · rubens A ₂ ^a							
excellens · rubens-cr ₁							
excellens · flavens-s							
excellens · flavens + s							
excellens · stringens							
excellens · elongans							

gleichartige Änderungen ihrer Werte zeigen, was aber nicht einmal innerhalb einer Sorte der Fall ist. Das Auftreten der Abweichungen innerhalb einer Pflanze ist weiterhin unabhängig von der untersuchten Komplexkombination, und auch ein Einfluß bestimmter Elternarten ist nicht zu erkennen, denn die genetisch gleichen Pflanzen einer Sorte können sich sehr verschiedenartig verhalten. Von 28 Sorten wurden je 2 Pflanzen untersucht. Davon sind bei insgesamt 19 Pflanzen die Werte homogen, bei 37 inhomogen. Wenn keine sortenbedingte Korrelation zwischen genetisch gleichen Pflanzen besteht, also eine unabhängige Reaktion der einzelnen Individuen gegeben ist, werden bei 28 Zweier-Gruppen erwartet: in 3,3 Fällen beide Pflanzen homogen, in 12,2 Fällen beide inhomogen und in 12,5 Fällen je eine Pflanze aus beiden Klassen. Gefunden wurden 5, 9 und 19, was eine sehr gute Übereinstimmung darstellt ($\chi^2=1,09$; $P=0,7-0,5$). Ähnliches läßt sich auch bei den Gruppen aus 3 und 4 Pflanzen feststellen, nur sind diese zu wenig zahlreich, um einen statistischen Nachweis der Sortenunabhängigkeit der Reaktion zu gestatten. Eine genetische Grundlage für die vergrößerte Variabilität, etwa von der Art, daß eine bestimmte Reaktionsweise bei einer Sorte bevorzugt auftritt, ist demnach nicht gegeben. Die Ursache für die übernormale Variabilität des Anteils der tauben Samen zwischen den Kapseln einer Infloreszenz muß also in noch unbekannten, nicht-genetischen Faktoren liegen.

II. Die Variabilität zwischen den Pflanzen einer Sorte

a) Vorbereitung der Untersuchung. Der nächste Schritt der Untersuchung zielt darauf ab, die Variabilität zwischen Pflanzen gleicher genetischer Konstitution näher zu erfassen. Die Selbstungen wurden für diese Prüfung so durchgeführt, daß möglichst die ersten Blüten verwendet wurden oder, falls dies nicht möglich war, doch Blüten aus dem untersten Teil der Infloreszenz zu Beginn der Blütezeit. Alle Pflanzen einer Sorte wurden gleichzeitig geselbstet. Die inneren und äußeren Bedingungen, unter denen die betreffenden Blüten während der Entwicklung ihrer Samenanlagen gestanden hatten, waren dadurch möglichst

Tabelle 5. Variabilität zwischen den Pflanzen einer Sorte (je Pflanze wurden 10 Kapseln gepri-

	Anzahl der geprüf- ten Pflanzen <i>n</i>	Mittlerer Anteil der tauben Samen je Kapsel (<i>M</i>) %	Varianz			$V_{Pfl.}/V_{Rest}$		$V_{Kapseln}/V_{Rest}$		$V_{Rest}/$	
			zwischen Pflanzen	zwi- schen Kapsel- stel- lungen	Rest	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	
biennis München × biennis apetala cruciat	13	5,5	173,69	31,70	24,43	6,95	< 0,01	1,29	> 0,05	2,99	<
biennis A ₂ a × biennis apetala cruciat . . .	20	5,2	96,50	10,84	17,65	5,58	< 0,01	0,61	> 0,05	2,10	<
biennis apetala erweitert × biennis apetala cruciat	28	5,2	120,88	22,36	18,69	6,42	< 0,01	1,19	> 0,05	2,30	<

einheitlich, und Differenzen der jahreszeitlichen Witterung oder des Entwicklungszustandes der Pflanzen konnten nicht als zusätzliche Variationsursachen in Betracht kommen.

Für die statistische Auswertung wurde wieder die Winkeltransformation der %-Zahlen herangezogen und dadurch eine Varianzanalyse ermöglicht. Da jede Kapsel sowohl einer Mutterpflanze wie einer Stellung innerhalb der Infloreszenz eindeutig zugeordnet ist, lassen sich die Summe der Abweichungsquadrate und die Freiheitsgrade aufteilen in die Komponenten „zwischen Pflanzen“, „zwischen Kapselstellungen“ und „Rest“. Die Wechselwirkung „Pflanze × Stellung der Kapsel“ ist im Rest enthalten und läßt sich zunächst nicht abtrennen. Jede Probe besteht wiederum aus 100 Samen, so daß außerdem die theoretische Varianz der Einzelwerte bekannt ist ($V_{\phi} = 8,21$). Die Varianzverhältnisse Pflanze/Rest und Stellung/Rest geben an, inwieweit Differenzen zwischen den einzelnen Pflanzen bzw. der Stellung der Kapseln an der Infloreszenz bestehen, während das Verhältnis V_{Rest}/V_{ϕ} anzeigt, ob die Einzelwerte nach Abzug des Einflusses, den Mutterpflanze und Stellung haben, noch stärker voneinander abweichen, als dies auf Grund zufälliger Streuung möglich ist. Die Sicherung dieses Quotienten zeigt an, daß im „Rest“ noch zusätzliche Variabilitätsursachen enthalten sind. Hierfür ist die Wechselwirkung „Pflanze × Kapselstellung“ als erste in Betracht zu ziehen. Wenn die Veränderungen innerhalb der Infloreszenz zwischen den übereinanderstehenden Blüten bei den einzelnen Pflanzen in verschiedener Richtung liegen, also eine Wechselwirkung vorhanden ist, wird sich dies in einer Vergrößerung der Restvarianz über das Zufallsmaß hinaus auswirken. Der statistische Nachweis einer solchen Vergrößerung läßt daher einen Rückschluß auf das Vorhandensein der genannten Wechselwirkung zu, der noch gestützt wird, wenn die Varianz „zwischen Kapseln“ gering ist.

Aus der Untersuchung der ganzen Pflanzen ließ sich entnehmen, daß bei 10 Kapseln je Pflanze bereits der größte Teil der Variabilität zwischen den einzelnen Blüten erfaßt wird, so daß für die erste Prüfung der Unterschiede zwischen den Pflanzen dieser Versuchsumfang ausreichend ist.

b) Untersuchungen an 4 Sorten mit vielen Pflanzen. Für 4 willkürlich ausgewählte Sorten wurde an einer größeren Anzahl von Pflanzen der Anteil an tauben Samen in je 10 übereinanderstehenden Kapseln untersucht (Kapsel 1 = unterste, Kapsel 10 = oberste Frucht dieser Gruppe). Für alle 4 Sorten ist die Variabilität zwischen den Pflanzen größer als zwischen den Kapseln einer Pflanze, während die Streuung zwischen den Stellungen der Kapseln praktisch gleich der Reststreuung ist (Tabelle 5). Die Restvarianz ist jedoch regelmäßig größer als die Streuung, die auf Grund der theoretischen Verteilung von %-Zahlen zu erwarten ist. Für 3 Sorten variieren die Mittelwerte für die 1.—10. Kapsel unregelmäßig. Für die 4. Sorte schien ein Anstieg der Mittelwerte von der 1. zu der letzten Kapsel vorhanden zu sein. Die Prüfung ergab jedoch, daß keine Regression vorliegt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Variabilität innerhalb der Sorte *Oe. (biennis apetala cruciat × biennis Hannover) albicans-cr₁ · rubens H.*Versuchsumfang: 24 Pflanzen mit je 10 Kapseln. $M = 12,7\%$ taube Samen je Kapsel

Variationsursache	Endanalyse					
	Summe quadratischer Abweichung	Freiheitsgrade	V	V/V_{Rest}		F
				F'	P	
Total	3075,79	239	12,87			
Differenz der Mittelwerte .	566,64	23	24,64	2,4	<0,01	
Summe der Regressionen . .	460,03	24				
Totalregression	57,06	1	57,06	5,7	<0,05	
Differenz zwischen Regressionen	402,97	23	17,52	1,7	<0,05	3,2
Rest	2049,12	192	10,67			
V_{ϕ}		99	8,21			1,3
						<0,05

c) Untersuchung weiterer Sorten. Da die Variabilität zwischen den Pflanzen durchweg größer ist als zwischen den Stellungen der Kapseln, mußte dies bei der Auswertung der weiteren Sorten berücksichtigt werden. Um den Arbeitsumfang nicht zu groß werden zu lassen, wurden für 83 Sorten von je 10 Pflanzen 5 übereinanderstehende Kapseln aus dem unteren Teil der Infloreszenz untersucht. Für 8 weitere Sorten lag nur Material von 5—9 Pflanzen vor, aber meist mit entsprechend mehr Kapseln je Pflanze. Von 15 Sorten wurde die Aufzucht ein zweites Mal wiederholt, für eine Sorte 2mal. Bei der Selbstung dieser Blüten wurden die gleichen Grundsätze beachtet wie für die 4 zuerst genannten Sorten. Die Werte für 5 flavens-Bastarde, die in diese Liste aufgenommen und mit ausgewertet wurden, werden in Abschnitt IV näher erläutert. In Tabelle 7 ist eine Übersicht über dieses Material gegeben.

Die Varianzanalyse erfolgte ebenfalls in der beschriebenen Weise. Bei 10 Pflanzen mit je 5 Kapseln stehen 50 Beobachtungen, also 49 Freiheitsgrade zur Verfügung, von denen 9 für die Prüfung der Differenzen zwischen den Pflanzen und 4 für die Unterschiede zwischen den 5 Stellungen der Kapseln Verwendung finden. Für die Restvarianz verbleiben 36 Freiheitsgrade. Die Grenzwerte für das Verhältnis Pflanzenvarianz/Restvarianz sind dann $F = 2,16$ für $P = 0,05$ und $F = 2,95$ für $P = 0,01$. Für das Verhältnis zwischen der Varianz der Einzelwerte und der theoretischen Varianz von Proben aus je 100 Samen V_{Rest}/V_{ϕ} sind die entsprechenden Grenzwerte $F = 1,76$ bzw. 1,63. Bei den Proben mit anderen Werten als 10×5 Kapseln ändern sich die Freiheitsgrade und die Grenzwerte entsprechend (F -Tafel aus Post 1952). Die Wiederholungen in verschiedenen Jahren wurden dabei zunächst als eigene „Sorte“ gewertet. Der Vergleich verschiedener Aufzuchten derselben Komplexkombination in verschiedenen Jahren wird zusammen mit anderen Versuchen in Teil 2 behandelt werden (HARTE 1958a).

Die Endanalysen für alle Sorten sind in Tabelle 8 aufgeführt. Außerdem ist hierbei durch Zeichen angegeben, welche Differenzen in der betreffenden Sorte gesichert sind. Mit den Werten dieser Tabelle können mehrere Vergleiche durchgeführt werden. Zunächst können die Varianzen für die einzelnen Variabilitätskomponenten „zwischen Kapselstellungen“ und „zwischen Pflanzen“ mit der Restvarianz der betreffenden Sorte verglichen werden. Daneben ist aber auch ein anderer Vergleich möglich. Durch Addition aller Werte für die Summe der quadratischen Abweichung einer bestimmten Komponente in den verschiedenen Sorten und Division durch die Summe der zugehörigen Freiheitsgrade kann eine mittlere Varianz berechnet werden, zu der die entsprechende Varianz der einzelnen Sorte in Beziehung gesetzt werden kann. Mit Hilfe der F -Tafel lassen sich die Grenzwerte festlegen, zwischen denen bei $P = 0,01$ die betreffenden Varianzen liegen müssen, wenn alle als zufällige Stichproben aus einer einheitlichen Grundgesamtheit angesehen werden sollen.

Tabelle 7. Übersicht über das

Elternart ♂	♀						
	biennis München	biennis Hannover	biennis A _{2a}	biennis apetala cruciat	biennis apetala erweitert	suaveolens sulfurea	
						albicans	flavens
biennis M	10·5 11,84 10·5 5,23	10·5 11,18	10·5 6,84	10·5 12,24	10·5 14,64 5·10 2,80	10·5 9,42	
biennis H	10·5 8,36	10·5 10,24 10·5 7,08	10·5 7,36	10·5 11,36	10·5 12,32	10·5 8,34	
biennis A _{2a}	10·5 5,50	10·5 7,16		10·5 8,68	10·5 22,18		
biennis ape- tala cruciat	10·5 7,68	10·5 7,50	10·5 6,40 [3·10 + 0,53 1·15]	10·5 2,98 3·10 10,10	10·5 4,86	10·5 4,24	
biennis apetala erweitert	10·5 4,34 10·5 0,52	10·5 17,12	10·5 8,50	10·5 14,88 5·10 5,16	10·5 4,78 4·10 4,2		
suaveolens sulfurea	10·5 53,14 10·5 85,26	10·5 50,68	10·5 54,52	10·5 56,56 5·10 87,16 10·5 34,44	10·5 55,56	10·5 85,02	
suaveolens gelb	10·5 53,60	7·5 32,92 7·5 89,80	10·5 51,74	10·5 59,44	10·5 56,34 10·5 84,16		
suaveolens Grado	10·5 13,00	10·5 5,56		10·5 21,14	10·5 12,12	10·5 8,10	
strigosa	10·5 8,16		10·5 8,78	10·5 8,56	10·5 7,98		10·4 97
Cockerelli		10·5 6,48	10·5 57,40	10·5 58,46 10·5 87,50	10·5 60,36 [1·5 + 80,05 2·10 + 1·15]	2·15 3,30	8·4 98
chicaginen- sis		10·5 6,82	10·5 74,52	10·5 65,16	10·5 53,08		
muricata	10·5 10,84		10·5 9,88	10·5 11,82	10·5 10,06		

1. Zahl = Anzahl der untersuchten Pflanzen; 2. Zahl = Anzahl der untersuchten Kapseln je Pflanze (z. B.: 10·5 = 10 Pflanzen mit je 5 Kapseln); mehrere Zeilen = diese Sorte wurde in 2 oder 3 verschiedenen Jahren untersucht; letzte Zahl: Mittelwert in %.

Die Restvarianz, die ein Maß für die Variabilität zwischen den einzelnen Kapseln ist, ist bei fast 42 Sorten größer als die Varianz V_ϕ , d. h. die Einzelwerte streuen stärker, als auf Grund zufälliger Variationen zu erwarten ist. Wenn die Einzelwerte mit der mittleren Restvarianz verglichen werden, so ist in 23 Fällen $P < 0,01$. Dieses Ergebnis kann nicht mehr als zufällig angesehen werden.

Die durchschnittliche Variabilität zwischen den Kapseln einer Probe ist gesichert größer als auf Grund einer Zufallsverteilung zu erwarten wäre, aber die einzelnen Sorten verhalten sich dabei sehr unterschiedlich.

Die F -Werte für den Vergleich Kapselvarianz/Restvarianz als Maß für einen Unterschied als Folge der Stellung der Kapseln an der Infloreszenz sind für fast alle Sorten gleichartig. Für 103 Sorten liegt P über 0,05, für 6 Sorten zwischen 0,05 und 0,01 und nur 4mal dicht unter diesem Wert und nie unter $P < 0,001$. Da unter über 100 Proben erwartet werden kann, daß ein Wert soweit abweicht, daß $P < 0,01$ entsteht, hält sich das Auftreten vierer solcher Fälle noch im Rahmen des Zufälligen. Wenn die einzelnen Werte mit der mittleren Varianz für die Kapselstellung verglichen werden, so zeigt es sich, daß diese zwar variieren, aber nur für 8 Sorten $P < 0,01$ ist, wobei die Werte für 4 Sorten nur wenig unter dem unteren

Material des Abschnitts II

suaveolens gelb		suaveolens Grado albicans	strigosa	Cockerelli	chicaginis	muricata	atrovirens
albicans	flavens						
0·5 3,88				10·5 11,38	10·5 23,88		
0·5 8,28	10·4 33,43			9·5 14,16	10·5 29,94		
				10·5 5,26	9·5 18,67		
0·5 3,96					10·5 17,28		
				10·5 1,38	10·5 18,72		
0·5 71,86 0·5 79,90			5·9 86,24	10·5 30,98	10·5 29,26		
0·5 89,18					7·5 39,43		
		10·5 75,48					
	9·4 98,83		10·5 2,62	10·5 26,28	10·5 2,34 8·5 15,60		
0·5 89,00	7·4 98,43		10·5 4,78	10·5 5,42	10·5 53,76	10·5 84,66	
0·5 27,51			10·5 54,66	9·5 63,31			10·5 23,84

Grenzwert liegen und nur für 4 andere stärker nach oben abweichen, aber alle noch innerhalb der Grenzen für $P=0,001$ liegen.

Die Variabilität zwischen den aufeinanderfolgenden Kapseln ist also in den einzelnen Pflanzen unabhängig voneinander und folgt keinen allgemeinen Regeln, die eine gleichartige Veränderung des Anteils der tauben Samen mit steigender Kapselnummer vorschreiben würden. Sie ist im Durchschnitt mehrerer Pflanzen im allgemeinen gleich und unabhängig von der Sorte.

Für die Differenzen zwischen den Pflanzen liegen die Verhältnisse völlig anders. Der Vergleich der Varianz „zwischen den Pflanzen“ mit der sorteneigenen Restvarianz ergibt unter den 113 Sorten bei nur 38 einen P -Wert über 0,05, bei 7 zwischen 0,05 und 0,01 und für 57 Sorten $P < 0,01$. Weniger als die Hälfte der Sorten zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen den einzelnen Pflanzen, während die übrigen eine zweifelsfreie Inhomogenität aufweisen und die Zwischenwerte nur in sehr kleiner Anzahl auftreten. Gegenüber der durchschnittlichen Varianz dieser Spalte zeigen sich in 53 Fällen gesicherte Abweichungen. Die Variabilität zwischen den Pflanzen einer Sorte ist demnach zwischen den Sorten sehr verschieden groß.

Tabelle 8a. Zusammenstellung der Endanalysen für die Differenzen im Gehalt an tauben Samen
Sorten (Tabelle

Elternart ♀ ♂	biennis München	biennis Hannover	biennis A ₂ a	biennis apetala cruciat	biennis apetala erweitert	suaveolens sulfurea	
						albicans	flavens
biennis München .	23,9 (49) 3,3 (4) 45,3 (9) 20,8 (36)c	21,7 32,6 57,2a 11,6	11,3 7,3 16,8b 10,4	6,7 5,2 10,6b 5,9b	15,0 8,3 40,6a 9,4b	13,7 6,6 13,9b 14,4	
biennis Hannover .	14,5 22,6 9,5b 14,8c	18,2 15,5 37,7b 13,6	14,2 16,4 26,9b 10,8	10,7 8,4 8,0b 11,6	10,7 25,6 18,2b 7,2b	14,0 16,7 18,6b 12,6	
biennis A ₂ a . . .	15,9 3,1 28,3b 14,2	19,2 13,6 61,1a 9,3b		23,4 32,8 36,3b 19,1c	114,0 12,3 466,5ab 37,2bc		
biennis apetala cruciat	25,0 45,2 55,3a 15,2c	12,0 9,8 35,9a 6,3b	24,7 22,9 62,7a 15,4	16,1 20,4 15,9b 15,7	13,2 7,4 34,5ab 8,5b	40,5 2,5 119,4a 25,0c	
biennis apetala erweitert . . .	11,4 3,7 19,2b 10,3b	109,4 110,0b 420,0ab 31,6c	32,3 35,3 70,1a 22,5	61,7 14,5 210,0 29,9c	8,7 0,9b 27,3ab 4,9b		
suaveolens sulfurea	20,3 15,1 28,0b 19,0c	19,4 21,0 38,2 14,6	13,8 0,6b 39,0a 9,0b	19,2 13,4 35,3b 15,8c	12,3 7,0 18,7b 11,3	17,9 4,2 23,1b 18,1c	
suaveolens gelb . .	30,5 25,1 66,2a 22,1c	28,4 (34) 38,3 (4) 50,1 (6) 21,3 (24)c	17,7 23,0 23,4b 15,7c	14,2 43,3a 16,1b 10,5	19,1 6,9 58,8a 10,6		
suaveolens Grado .	57,3 16,2 193,1a 28,0c	32,7 18,5 116,8a 13,3		48,5 36,2 149,0 24,7c	32,2 29,6 100,1 15,6c	18,8 33,4 33,1 13,5	
strigosa	19,9 9,9 14,4b 22,4c		22,4 8,6 56,8a 15,3c	10,7 4,3 8,1b 12,0	17,2 42,0 11,1b 16,0c		35,5 (39) 57,9 (3) 54,7 (9) 26,6 (27)
Cockerelli		11,7 7,2 7,7b 13,2	13,7 7,5 14,9b 14,1	18,2 11,9 28,5b 16,4c	10,3 4,6 6,0b 12,1	36,2 (29) 38,2 (14) 156,4 (1)a 25,6 (14)c	28,1 (31) 24,8 (3) 68,4 (7) 15,1 (21)
chicaginensis . . .		7,5 3,3 7,5b 8,0b	44,9 28,3 167,4a 16,1c	45,8 41,3 122,5a 27,2c	15,8 20,1 21,3b 13,9		
muricata	32,8 14,2 79,9 23,0c		25,4 3,3 89,3a 11,9	30,6 15,4 101,6a 14,6	20,7 4,9 40,8 17,4c		

Anordnung der Werte (untereinander in folgender Reihenfolge):

 s^2 total, s^2 zwischen Kapselstellungen, s^2 zwischen Pflanzen, s^2 Rest,
jeweils berechnet nach Winkeltransformation der %-Werte.

Dazu in Klammern die Anzahl der Freiheitsgrade. Soweit hier keine besonderen An-

zwischen Pflanzen und zwischen Stellung der Kapseln an der Infloreszenz für alle untersuchten
8a = 1. Aufzucht)

suaveolens gelb		suaveolens Grado	strigosa	Cockerelli	chicaginisensis	muricata	atrovirens
albicans	flavens						
21,0 7,1 50,2a 5,3c				20,7 34,4 45,8a 12,9	20,9 16,9 61,7a 11,2		
26,2 6,5 1,9a 5,9c	471,9 (39) 41,6 (3) 1897,0 (9)a b 44,7 (27)c			23,9 (44) 11,7 (4) 16,8 (8)b 27,3 (32)c	19,8 63,0a 22,8b 14,2		
				34,0 0,5 111,1a 18,4c	35,7 (44) 15,4 (4) 103,2 (8)a 21,4 (32)c		
11,9 8,4 1,8a 3,8					36,7 12,7 136,5a 14,4		
				22,1 37,3 30,4b 18,3c	19,8 39,7 30,6b 14,9		
0,7 5,5 3,0a 3,5			33,8 (44) 7,6 (4) 87,6 (8)a 23,6 (32)c	175,6 6,0 805,5a b 30,9c	33,7 57,7 42,5 28,8c		
6,8 6,2 6,9a 9,0c					79,7 (34) 4,5 (4) 387,6 (6) 15,3 (24)		
		18,3 2,9 56,6a 10,4					
	27,4 (35) 12,4 (3) 29,9 (8)b 28,4 (24)		22,5 1,5b 29,0b 23,3c	559,4 177,2a b 2598,1a b 9,2b	27,4 19,8 63,2a 19,2c		
6,1 9,4 3,1 3,7c	32,5 (27) 1,4 (3) 71,0 (6) 24,9 (18)c		9,1 10,5 21,3a b 5,9b	30,1 9,7 102,0a 14,4	22,9 18,9 46,5 17,4c	20,9 16,9 32,4b 18,5c	
4,1 (44) 5,9 (4) 4,9 (8)a 7,4 (32)c			77,7 4,2 295,3a 31,5c	102,5 (44) 139,0 (4) 213,3 (8)a 70,2 (32)b			112,3 19,5 462,6a b 35,1b

gaben gemacht sind, stimmt die Anzahl der Freiheitsgrade mit denen der 1. Sorte überein.
a = mit $P < 0,01$ gesichert gegen die Restvarianz der Sorte; b = mit $P < 0,01$ gesichert
gegen die durchschnittliche Varianz der betreffenden Komponente; c = mit $P < 0,01$
gesichert gegen die Zufallsvarianz $V_{\phi} = 8,21$.

Tabelle 8b. *Ergänzung zu Tabelle 8a, Werte der 2. Aufzucht*

Sorte	Total	N	Zwischen Kapseln	n_1	Zwischen Pflanzen	n_2	Rest	n_3
Oe. biennis München	11,217	49	9,439	4	19,167 b	9	9,428 b	36
biennis München × biennis apetala erweitert	13,213	49	12,154	4	12,117 b	9	13,604	36
biennis München × suaveolens sulfurea	66,113	49	24,654	4	254,039 a	9	23,738	36
biennis Hannover	8,548	49	11,876	4	12,300 b	9	7,240 b	36
biennis apetala cruciat × suaveo- lens sulfurea	42,480	49	13,718	4	62,900	9	40,571 b	36
biennis apetala cruciat × Cocke- relli	17,247	49	15,063	4	36,978 a b	9	12,556	36
biennis apetala erweitert × sua- veolens gelb	23,167	49	10,030	4	33,023 b	9	22,162	36
suaveolens gelb × suaveolens sulfurea	85,128	49	55,834	4	175,006	9	65,913 b	36
biennis Hannover × suaveolens gelb	24,013	34	13,215	4	61,114 a	6	16,537 c	24
biennis A ₂ a × biennis apetala cruciat	14,010	44	6,130 b	14	87,070 a	3	9,980	27
biennis apetala cruciat	49,346	29	47,117	9	111,709	2	43,531 b c	18
biennis apetala cruciat × biennis apetala erweitert	99,484	49	21,342	9	913,494 a b	4	28,574 c	36
biennis apetala cruciat × suaveo- lens sulfurea	324,104	49	60,017 b	9	3278,099 a b	4	61,905 b c	36
biennis apetala erweitert × biennis München	28,321	49	56,481 a	9	158,139 a	4	6,849 b	36
biennis apetala erweitert	19,096	39	29,850	9	31,757	3	14,104	27
biennis apetala erweitert × Cocke- relli	50,640	39	44,660	14	55,710	3	53,750 b c	22
chicaginesis × strigosa	163,498	39	15,854	4	858,576 a b	7	10,821	28
durchschnittliche Varianz	45,72		24,56		163,86		19,54	

III. Vergleich der Variabilität „zwischen“ und „in“ Pflanzen

Die Beobachtung, daß die Varianz zwischen den Pflanzen meist größer ist als die Restvarianz, rechtfertigt jedoch nicht sofort den Schluß, daß zwischen den Pflanzen die Variabilität grundsätzlich größer ist als innerhalb einer Pflanze, denn bei der Untersuchung der ganzen Pflanzen wurde bereits darauf hingewiesen, daß benachbarte Kapseln meist dichter zusammenliegende Werte ergeben als weiter voneinander entfernte, so daß bei nur 5 Kapseln je Pflanze der Schätzwert der Varianz „in Pflanzen“ zu klein ausfallen könnte.

Um diesen Einwand zu prüfen, wurden aus Abschnitt I 7 Pflanzen, die Werte für ungefähr 50 Kapseln aufwiesen, ausgewählt. Die ersten 50 Kapseln wurden aufgeteilt in 10 Gruppen von je 5 zusammenliegenden Kapseln (Kapseln 1—5 = Gruppe 1, Kapseln 6—10 = Gruppe 2 usw.) und diese Zahlen in der gleichen Weise ausgewertet wie die Tabellen von je 5 Kapseln aus 10 Pflanzen. Die erhaltenen Varianzen wurden dann miteinander verglichen und zu den entsprechenden Werten aus 10 Pflanzen derselben Sorte in Beziehung gesetzt. Dieser Vergleich ist aus Tabelle 9 zu ersehen. Für 6 von den 7 Sorten ist die Varianz „zwischen den Pflanzen“ kleiner als die Varianz zwischen den Gruppen, die aus einer Pflanze gebildet wurden, aber nur in einem Falle ist dieser Unterschied zu sichern. Bei der letzten Sorte ist dagegen die Varianz „zwischen den Pflanzen“ größer als „zwischen den Gruppen“. Die Varianz „zwischen Kapselstellungen“ ist bei allen 7 Vergleichen im Rahmen der Fehlerbreite gleich. Für die Restvarianz ergeben sich in 2 Fällen Differenzen, die mit $P < 0,01$ gesichert sind, und zwar ist jedesmal die Restvarianz für die in Gruppen aufgeteilte Pflanze größer.

Tabelle 9. Vergleich der Variabilität zwischen 50 Kapseln von einer und von mehreren Pflanzen
1. = aufgeteilte Infloreszenz; 2. = 10 Pflanzen mit je 5 Kapseln

Sorte	Zwischen Pflanzen (Gruppen) 9			Zwischen Kapseln 4			Rest 36	Frei- heits- grade
	S^2	F'	P	S^2	F'	P	S^2	F
biennis apetala cruciat.	1.	94,510	1,090	> 0,05	12,886	4,820	17,366	2,157
biennis apetala cruciat.	2.	86,710			62,111		37,451	
biennis München × biennis Hannover	1.	14,474			22,379		30,508	
biennis München × biennis Hannover	2.	9,452	> 0,05		22,552	1,008	14,821	2,058
biennis A_{2a} × biennis Hannover	1.	74,524			4,210		27,597	
biennis A_{2a} × biennis Hannover	2.	26,874	> 0,05		16,365	3,887	10,821	2,550
biennis A_{2a} × biennis München	1.	61,520			13,361		10,716	
biennis A_{2a} × biennis München	2.	16,763	> 0,01		7,309	1,828	10,423	1,028
biennis A_{2a} × biennis apetala cruciat.	1.	52,989			10,659		16,588	
biennis A_{2a} × biennis apetala cruciat.	2.	62,705	> 0,05		22,854	2,144	15,412	1,076
biennis apetala cruciat × biennis Hannover	1.	48,450			16,347		33,018	
biennis apetala cruciat × biennis Hannover	2.	7,981	< 0,01		8,440	1,937	11,637	2,837
biennis apetala cruciat × biennis apetala erweitert	1.	19,543			28,517		28,624	
biennis apetala cruciat × biennis apetala erweitert	2.	209,991	< 0,01		14,526	1,963	29,888	1,044

Tabelle 10. *Auswertung einiger unvollständig untersuchter Sorten*

Sorte	Komplexe	Pflanzen	Kapseln	Samen	taub %	Extrem- werte der Einzel- pflanzen %	χ^2 (Homo- genität zwischen Pflanzen)	P
biennis apetala erweitert × suaveolens sulfurea	balbicans-cr ₂ · flavens —s	8	63	4919	74,9	55,6—89,0	373,8	< 0,
biennis apetala erweitert × Cockerelli	balbicans-cr ₂ · elongans	6	48	4250	64,1	21,0—79,4	519,3	< 0,
chicaginesis × suaveo- lens Grado	excellens · flavens Grado	6	63	3006	60,9	53,5—72,9	57,6	< 0,
biennis Hannover × Cockerelli	balbicans H · elongans	3	—	3000	68,3	55,5—75,0	114,2	< 0,
biennis Hannover × chicaginesis	balbicans H · punctulans	3	—	3000	67,4	64,1—70,4	9,12	0,05—
biennis Hannover × mu- ricata	balbicans H · curvans	3	—	3000	14,8	8,3—26,5	503,19	< 0,
suaveolens sulfurea × strigosa	salbicans · stringens	3	—	3800	7,9	3,9—15,4	119,08	< 0,
suaveolens sulfurea × Cockerelli	salbicans · elongans	3	—	3000	48,3	41,6—56,2	43,35	< 0,
suaveolens sulfurea × chicaginesis	salbicans · punctulans	3	—	3000	61,5	58,4—62,0	4,08	0,2—
suaveolens sulfurea × muricata	salbicans · curvans	2	—	2000	7,7	5,5—9,8	13,08	< 0,

Diese Prüfung beweist, daß die Differenz zwischen den 10 Fünfergruppen aus je einer Pflanze nicht in vollem Umfang als Pflanzen-Differenzen zu deuten sind. Die Ursache wird vielmehr darin zu suchen sein, daß die Häufigkeit der tauben Samen stark variiert, aber nahe zusammenliegende Kapseln sehr häufig ähnliche Werte zeigen. Es muß also nicht ein eigener „Pflanzenfaktor“ angenommen werden, der für die einzelnen Pflanzen ein unterschiedliches Niveau bestimmen würde, auf dem die weiteren Variationen sich aufbauen, sondern die Differenzen zwischen den Pflanzen sind nicht größer, als bei Stichproben des gegebenen Umfangs aus stark und in der beschriebenen Weise variierenden Infloreszenzen erwartet werden kann.

IV. Ergänzende Untersuchungen

Von einigen Komplexkombinationen stehen nur unvollständige Untersuchungen zur Verfügung. Diese bestehen z. T. aus Auszählungen von wechselnder Anzahl von Kapseln je Pflanze und Samen je Kapsel, z. T. wurden die Samen aus mehreren Kapseln jeder Pflanze gemischt und davon eine bestimmte Anzahl (meist 1000 je Pflanze) ausgezählt. Diese Auszählungen zeigen ebenfalls die für die übrigen Sorten beschriebene Variabilität zwischen den Pflanzen (Tabelle 10). Dabei wurde die Homogenität der Verteilung auf die Klassen „taub“ und „keimhaltig“ mit dem χ^2 -Test geprüft.

Eine besondere Erläuterung ist für die *flavens*-Kombinationen zu geben, bei denen dieser Komplex durch die Eizelle in den Bastard gelangte und hier mit einem Pollenkomplex kombiniert wurde. Die Verhältnisse liegen anders als bei den übrigen Sorten, denn *flavens* ist sowohl in den Eizellen wie im Pollen voll funktionsfähig. Der Pollen dieser Bastarde ist daher genetisch nicht einheitlich und enthält neben 50% Körnern mit dem ursprünglichen Pollenkomplex auch 50% *flavens*. Beide enthalten Letalfaktoren, so daß nach Selbstung die auftretenden tauben Samen verschiedene genetische Konstitutionen besitzen. Eine Bestimmung der Konkurrenz im Embryosack ist auf diese Weise nicht möglich. Es wurden daher Rückkreuzungen mit dem *suaveolens*-Elter vorgenommen, wobei eine Befruchtung durch reinen *flavens*-Pollen gewährleistet ist. Die tauben Samen haben die genetische Kon-

Tabelle 11. *Auswertung einiger flavens-Bastarde*

Sorte	Komplexe	Pflanzen	Kapseln	Samen	taub %	χ^2 (Homo- genität zwischen Pflanzen)	P
<i>colens sulfurea</i> × <i>biennis</i> München	flavens — s · rubens M	8	26	1213	41,6	42,4	< 0,001
<i>colens sulfurea</i> × <i>biennis</i> Hannover	flavens — s · rubens H	15	48	3283	38,0	115,5	< 0,001
<i>colens sulfurea</i> × <i>biennis</i> apetala ciat	flavens — s · rubens-cr ₁	13	37	1994	40,8	332,5	< 0,001
<i>colens sulfurea</i> × <i>biennis</i> apetala weitert	flavens — s · rubens-cr ₂	14	34	2050	44,1	87,7	< 0,001
<i>colens sulfurea</i> × <i>strigosa</i>	flavens — s · stringens	22	72	3610	97,3	39,1	< 0,001
<i>colens sulfurea</i> × Cockerelli	flavens — s · elongans	7	20	2000	98,9	28,1	< 0,0
<i>colens sulfurea</i> × <i>chicaginisensis</i>	flavens — s · punctulans	6	24	1750	62,7	332,4	< 0,001
<i>colens</i> gelb × <i>biennis</i> München	flavens + s · rubens M	3	9	400	2,5	0,9	> 0,05
<i>colens</i> gelb × <i>biennis</i> Hannover	flavens + s · rubens H	12	50	2500	31,5	896,1	< 0,001
<i>colens</i> gelb × <i>biennis</i> A _{2a}	flavens + s · rubens A	7	17	775	16,8	63,6	< 0,001
<i>colens</i> gelb × <i>biennis</i> apetala ciat	flavens + s · rubens-cr ₁	5	19	1150	2,4	39,6	< 0,001
<i>colens</i> gelb × <i>biennis</i> apetala weitert	flavens + s · rubens-cr ₂	7	21	1125	8,6	26,6	< 0,001
<i>colens</i> gelb × <i>strigosa</i>	flavens + s · stringens	19	69	2900	97,0	347,0	< 0,001
<i>colens</i> gelb × Cockerelli	flavens + s · elongans	6	24	1575	98,3	10,9	0,1—0,05
<i>colens</i> gelb × <i>chicaginisensis</i>	flavens + s · punctulans	5	23	1525	14,9	61,6	< 0,001

stitution *flavens* · *flavens* und geben den Anteil dieser Komplexkombination in den Eizellen wieder. Die embryohaltigen Samen müssen aus Eizellen mit dem Pollenkomplex hervorgegangen sein, im Gegensatz zu den übrigen Sorten. Für die Berechnung der Varianzen als Maß für die Variabilität ergibt sich hieraus jedoch kein Unterschied. Bei dem in anderem Zusammenhang durchgeführten Vergleich über das Verhalten der einzelnen Pollenkomplexe wird dies jedoch berücksichtigt (HARTE 1958b).

Für 5 dieser Sorten wurden aus den Kreuzungen genügend Samen erhalten, um die Varianzanalyse durchzuführen. Diese sind in die Tabellen aufgenommen und gemeinsam mit den übrigen Sorten ausgewertet. Für einige andere Bastarde ergaben die Kapseln aus den Rückkreuzungen nicht genügend Samen für eine solche Berechnung. Hier wurden alle Samen, die aus der Bestäubung mehrerer Blüten einer Pflanze erhalten wurden, zusammengefaßt und die Homogenität der Verteilung auf die beiden Klassen „taub“ und „keimhaltig“ zwischen verschiedenen Pflanzen mit Hilfe des χ^2 -Testes geprüft. Diese Daten sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Sie ergeben keine neuen Gesichtspunkte gegenüber den Befunden an den besser untersuchten Sorten, sie wurden hier jedoch angeführt, weil sie an anderer Stelle für weitere Vergleiche verwendet werden sollen (HARTE 1958b).

D. Diskussion

Von den eingangs aufgeworfenen Fragen läßt sich auf Grund der hier dargestellten Untersuchungen zunächst eine beantworten. Die Untersuchung des Anteils der tauben Samen je Kapsel ergab für die einzelnen Sorten eine Reihe von gemeinsamen Gesichtspunkten. Das auffallendste Ergebnis ist, daß die Variabilität zwischen den Kapseln einer Infloreszenz und zwischen verschiedenen Pflanzen einer Sorte übernormal groß ist, d. h. daß die Differenzen zwischen den einzelnen Kapseln größer sind, als bei zufälliger Probeentnahme aus einer einheitlichen Grundgesamtheit zu erwarten ist. Dies bedeutet aber, daß das untersuchte Merkmal von Faktoren beeinflusst wird, die nicht unter die Zufallswirkungen einzureihen sind. Es fragt sich nun, welche Angriffspunkte für die Wirkung derartiger Faktoren gegeben sind.

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, treten taube Samen bei den untersuchten Formen als Folge der Wirkung von Letalfaktoren dann auf, wenn in der Samenanlage eine Gone mit dem „Pollenkomplex“ die Eizelle bildete und diese durch einen Pollenschlauch mit dem gleichen Komplex befruchtet wurde. Aus der unterschiedlichen Häufigkeit der tauben Samen kann also geschlossen werden, daß Samenanlagen mit derartigen Embryosäcken in wechselnder Häufigkeit auftreten. Dies läßt den Schluß zu, daß der Vorgang, der zu ihrem Auftreten führt bzw. es verhindert, nämlich die Konkurrenz zwischen den genetisch verschiedenen Gonen in der Tetrade, variabel ist, so daß die Wahrscheinlichkeit, mit der Gonen bestimmter genetischer Konstitutionen den Embryosack bilden, von einem Fruchtknoten zum anderen verschieden ist. Als Ursache für diese Variabilität lassen sich verschiedene Punkte anführen, und es ist zu prüfen, welche davon im vorliegenden Material wirksam sind.

Es ist bekannt, daß die Lage der Gone in der Tetrade und ihre genetische Konstitution für die Entscheidung darüber, welche den Embryosack bilden wird, von Bedeutung sind. Wenn der 1. Faktor ausschlaggebend wäre, wäre für beide Komplexe, die in einer Form vereinigt sind, die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens im Embryosack gleich, d. h. es würden 50% tauber Samen erwartet, und zwischen den Kapseln dürften keine Differenzen beobachtet werden, die über das zufällig Mögliche hinausgehen. Wäre dagegen der 2. Faktor allein bestimmend, so müßten alle Eizellen die gleiche genetische Konstitution besitzen. Da aber keine dieser beiden Möglichkeiten realisiert ist, sondern der Pollenkomplex durchaus in der Samenanlage auftreten kann, aber in stark schwankender Häufigkeit, so können auch beide Faktoren zusammen nicht von vornherein eindeutig bestimmen, welche Gone in einer bestimmten Samenanlage den Embryosack bilden wird. Es ist vielmehr nur eine bestimmte Wahrscheinlichkeit dafür gegeben, daß ein bestimmter Komplex unter den gegebenen Umständen sich in der Konkurrenz um die Bildung des Embryosackes durchsetzen wird. In einer bestimmten Samenanlage kann sich durchaus eine Gone, die auf Grund ihrer genetischen Konstitution eigentlich benachteiligt sein sollte, doch durchsetzen. Es ist also zu suchen nach den Einflüssen, die hierbei wirksam werden.

Unter den Faktoren, die die Konkurrenz zwischen 2 Gonen einer Tetrade in der Samenanlage beeinflussen, gibt es sicher solche, die direkt an den konkurrierenden Gonen angreifen und diese schwächen oder stärken und somit darüber entscheiden, welche der konkurrierenden Zellen in dieser bestimmten Samenanlage den Embryosack bilden wird. Das Vorhandensein derartiger Faktoren, die von einer Samenanlage zur anderen variieren werden, kann bei dem vorliegenden Untersuchungsplan nur erschlossen, aber nicht im einzelnen erfaßt werden, da für die einzelne Samenanlage zwar das Ergebnis feststeht (entweder setzte der Pollenkomplex sich durch oder nicht), aber über die Stärke der dabei wirkenden Einflüsse keine Aussage möglich ist. Es wird aber auch nicht mit einzelnen Samenanlagen, sondern mit einem Durchschnitt aus Proben bestimmten Umfanges (je 100 Samen) gearbeitet. Es liegt in der Natur von auf solche Weise gewonnenen Daten, daß derartige Einflüsse, die für den Einzelfall variieren, unabhängig von der Anzahl verschiedenartiger Einwirkungen, der Häufigkeit, mit der sie einwirken, und ihrer Stärke, im Durchschnitt vieler Proben gleichbleiben und daß die Mittelwerte, die von Stichproben aus einer derartigen

Einflüssen ausgesetzt, statistischen Masse gewonnen wurden, immer einer Normalverteilung folgen, d. h. eine „normale“ Streuung aufweisen müssen. Die Verwendung von Mittelwerten aus Stichproben genügenden Umfanges als Beobachtungsmaterial, wie es hier vorliegt, gestattet keinerlei direkte Aussagen über die Wirkungsweise solcher im Einzelfall angreifender Faktoren über die Feststellung ihrer Existenz hinaus. Wenn aber die Mittelwerte eine übernormale Streuung aufweisen, so ist damit der Nachweis erbracht, daß die Faktoren, die für diesen Anteil der Variabilität verantwortlich sind, nicht in der oben beschriebenen Weise direkt an den einzelnen Samenanlagen angreifen können, sondern daß sie jeweils auf eine ganze Stichprobe einwirken und die Wahrscheinlichkeit dafür, daß sich in ihr unter der Wirkung der Zufallseinflüsse ein bestimmter Komplex durchsetzt, verändern. Wenn die Variabilität zwar übernormal, aber in der ganzen Infloreszenz gleichmäßig wäre, so könnte angenommen werden, daß diese Einflüsse an den einzelnen Fruchtknoten angreifen und einheitlich auf alle darin befindlichen Samenanlagen wirken. Es ließ sich jedoch zeigen, daß benachbarte Fruchtknoten meist ähnlicher reagieren als weiter voneinander entfernte. Der Einfluß muß also primär auf die ganze Pflanze einwirken und deren Zustand so verändern, daß für die nacheinander entstehenden Blüten die Voraussetzungen für das Durchsetzen eines bestimmten Komplexes meist langsam, seltener sprunghaft, verändert werden. Es lassen sich bis jetzt keine Aussagen darüber machen, welcher Art diese variierenden Einflüsse sind und auf welchen Vorgang sie primär einwirken.

Zusammenfassung

1. An 113 Arten und Bastarden von *Oenothera* wurde die Häufigkeit der tauben Samen bestimmt. Die Auswertung erfolgte getrennt nach Kapseln und Pflanzen.
2. Zwischen den Kapseln einer Infloreszenz bestehen Unterschiede im Gehalt an tauben Samen, die größer sind, als durch zufällige Schwankungen möglich ist.
3. Die Differenzen folgen keinem bestimmten Gradienten an der Infloreszenz. Ein Zusammenhang mit der Stellung der Kapseln, d. h. mit dem Entwicklungszustand der Pflanze z. Z. der Ausbildung der Samenanlagen, ist nicht festzustellen.
4. Zwischen den Pflanzen einer Sorte zeigen sich übernormale Differenzen, die größer sind als die Unterschiede zwischen nahe zusammenliegenden Kapseln, aber nicht größer als die Schwankungen innerhalb ganzer Infloreszenzen.
5. Bei der gegebenen Versuchsanordnung ist der Anteil der tauben Samen ein Maß für das Auftreten des „Pollenkomplexes“ in der Eizelle. Die Schwankungen im Gehalt an tauben Samen gehen daher zurück auf Unterschiede im Anteil der Samenanlagen mit dem Pollenkomplex.
6. Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Konkurrenzfähigkeit eines bestimmten Pollenkomplexes in der Kombination mit einem bestimmten Eizellenkomplex nicht unveränderlich festliegt, sondern innerhalb eines Individuums mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen ist.
7. Die Konkurrenz in der Samenanlage um die Bildung des Embryosackes wird daher nicht nur von der genetischen Konstitution der beiden Komplexe bestimmt, sondern kann durch verschiedene, noch unbekannte Faktoren beeinflusst werden.

8. Neben Einflüssen, die direkt an den konkurrierenden Gonen angreifen, muß wenigstens ein Faktor vorhanden sein, der primär nicht dort, sondern indirekt über die Mutterpflanze auf den Vorgang einwirkt.

Literatur

CORRENS, C.: Ein Fall experimenteller Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. S.-B. preuß. Akad. Wiss. **51**, 685—717 (1917). — Fortsetzung der Versuche zur experimentellen Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. S.-B. Akad. Wiss. **50**, 1175—1200 (1918). — Versuche bei Pflanzen das Geschlechtsverhältnis zu verschieben. Hereditas (Lund) **2**, 1—24 (1921). — Zweite Fortsetzung der Versuche zur experimentellen Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. S.-B. preuß. Akad. Wiss. **18**, 330—354 (1921). — Der Einfluß des Alterns der Keimzellen auf das Zahlenverhältnis spaltender Bastarde. Naturwissenschaften **9**, 313—315 (1921). — Über den Einfluß des Alterns der Keimzellen. I. Dritte Fortsetzung der Versuche zur experimentellen Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. S.-B. preuß. Akad. Wiss. **1924**. — FISHER, R. A., and F. YATES: Statistical tables für biological, agricultural and medical research. London: Oliver & Boyd 1948. — HARTE, C.: Cytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden *Oenothera*-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 495—640 (1948). — Untersuchungen über die Nachkommenschaft von Heterozygoten der graminifolia-Koppelungsgruppe von *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 480—507 (1952). — Untersuchungen über Gonenkonkurrenz und crossing-over bei spaltenden *Oenothera*-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 97—117 (1953). — Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. II. Die Umweltkomponente der Variabilität. Z. Vererb.-Lehre **89**, 497—507 (1958). — Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. III. Die genetische Komponente der Variabilität. Z. Vererb.-Lehre (in Vorbereitung). — MATHER, K.: Statistical analysis in biology. London: Methuen & Co. 1949. — RENNER, O.: Die tauben Samen der *Oenotheren*. Ber. deutsch. bot. Ges. **36**, 172 (1916). Versuche über die gametische Konstitution der *Oenotheren*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **18**, 121—294 (1917). — Heterogamie im weiblichen Geschlecht und Embryosackentwicklung bei den *Oenotheren*. Z. Bot. **13**, 609—621 (1921). — Zur Kenntnis der Letalfaktoren und des Koppelungswechsels der *Oenotheren*. Flora (Jena), N. F. **27**, 215—250 (1933). — Kurze Mitteilung über *Oenothera*. IV. Über die Beziehungen zwischen Heterogamie und Embryosackentwicklung und über diplarrhene Verbindungen. Flora (Jena), N. F. **34**, 145—158 (1940).

Prof. Dr. CORNELIA HARTE,
Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln,
Köln-Lindenthal (Rhein), Gyrhofstraße 17

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität Köln

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GONENKONKURRENZ IN DER SAMENANLAGE BEI *OENOTHERA* UNTER VERWENDUNG DER LETALFAKTOREN ALS MARKIERUNGSGENE

II. Mitteilung

DIE UMWELTKOMPONENTE DER VARIABILITÄT*

Von

CORNELIA HARTE

(Eingegangen am 23. April 1958)

A. Einleitung

Im 1. Teil dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß bei *Oenothera* die Gonenkonkurrenz im Embryosack zwischen den beiden in einer Sorte vereinigten Komplexen nicht nur zufälligen Schwankungen unterworfen ist (HARTE 1958). Die aufgefundenen Differenzen zwischen genetisch gleichartigen Pflanzen und zwischen den Blüten einer Pflanze müssen durch zunächst noch unbekannte Faktoren verursacht werden, die einen Einfluß auf die Konkurrenzverhältnisse zwischen den Gonen einer Tetrade ausüben. Es konnte dabei als wahrscheinlich herausgestellt werden, daß diese Faktoren z. T. nicht direkt an den Gonen angreifen, sondern ihre Wirkung auf dem Weg über die Mutterpflanze ausüben. Eine experimentelle Beeinflussung einzelner Samenanlagen ist nicht möglich, und somit ist die 1. Gruppe von Faktoren nicht näher zu fassen. Es lag also nahe, den 2. Fragenkomplex anzugreifen und zu prüfen, inwieweit durch Veränderungen der Außenbedingungen, denen eine Pflanze während der Entwicklung der Infloreszenz ausgesetzt ist, auf die Konkurrenzverhältnisse in den Samenanlagen eingewirkt werden kann. Hierfür wurden zunächst 2 Versuchsserien verwendet. Die erste besteht in der Aufzucht der gleichen Sorte unter den Bedingungen des Versuchsgartens in verschiedenen Jahren, die andere in der gleichzeitigen Aufzucht unter den „Normalbedingungen“ des Versuchsgartens und als Mangelkulturen. Als Maß für die Gonenkonkurrenz wurde wieder die Häufigkeit der tauben Samen verwendet. Für die Grundlagen sei auf den 1. Teil dieser Untersuchungen verwiesen.

B. Material und Methode

Als Versuchsmaterial dienten die gleichen Arten und Bastarde, die bereits im 1. Teil bearbeitet wurden. Die Aufzucht der Pflanzen, Selbstung der Blüten und Auszählung der Samen erfolgte nach der dort beschriebenen Methode. Für die Mangelkulturen wurden die Pflanzen in Töpfe gepflanzt und im Freiland eingesenkt bis zur Entwicklung der Infloreszenz. Die Töpfe wurden regelmäßig gelockert, um Durchwurzelung zu verhindern. Nach dem Schossen wurden die Töpfe herausgenommen und ohne weitere Düngung und mit dem gerade ausreichenden Minimum an Wasserzufuhr zur Blüte gebracht. Die Pflanzen zeigten durch blässere Laubfärbung, völliges Fehlen der Verzweigung und geringere Anzahl der Blüten an der Infloreszenz deutlich an, daß sie unter extremen Mangelbedingungen standen. Der Samenansatz in den geselbsteten Blüten war geringer als normal. — Die im einzelnen verwendeten statistischen Auswertungsmethoden werden an den betreffenden Stellen erwähnt.

* R. HARDER zum 70. Geburtstag gewidmet.

C. Versuchsergebnisse

I. Vergleich zwischen Aufzuchten in verschiedenen Jahren

a) Vergleich der Mittelwerte. Insgesamt wurden 22 Sorten mehrfach aufgezogen, davon 4 Sorten in 3 Jahren. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über dieses

Tabelle 1. Übersicht über das Material. Die Zahlen geben die Anzahl der Pflanzen und die Anzahl der Kapseln je Pflanze ($10 \cdot 5 = 10$ Pflanzen mit je 5 Kapseln) in den Vergleichsjahren an. Die mit *M* bezeichneten Sorten wurden für die Untersuchung der Wirkung der Mangelkultur verwendet

Elternarten ♂	Elternarten ♀							
	biennis München	biennis Han- nover	biennis A ₂ a	biennis apetala cruciat	biennis apetala erweitert	sua- veolens sulfurea albicans	sua- veolens gelb albicans	chicagi- nensis
Oe. biennis München	10 · 5 10 · 5				10 · 5 5 · 10			
biennis Hannover	<i>M</i>	10 · 5 10 · 5	<i>M</i>	<i>M</i>				
biennis apetala cruciat			10 · 5 [3 · 10 + 1 · 15]	10 · 5 3 · 10				
biennis apetala erweitert	10 · 5 10 · 5 <i>M</i>			10 · 5 5 · 10	10 · 5 4 · 10			
suaveolens sulfurea	10 · 5 10 · 5 <i>M</i>		<i>M</i>	10 · 5 10 · 5 5 · 10 <i>M</i>	x		10 · 5 10 · 5	
suaveolens gelb		7 · 5 7 · 5			10 · 5 10 · 5			
strigosa		x	<i>M</i>	<i>M</i>		x		8 · 5 10 · 5
Cockerelli		x	<i>M</i>	10 · 5 10 · 5 <i>M</i>	10 · 5 [1 · 5 + 2 · 10 + 1 · 15]	x		
chicaginis		x						

x = von diesen Sorten liegen nur summarische Auszählungen vor. Einzelheiten über den Umfang dieses Materials enthält Tabelle 4.

Material, aus der zu entnehmen ist, welche Komplexkombinationen im einzelnen verwendet wurden. In 16 Fällen wurden beide Proben, wie im 1. Teil beschrieben, nach Pflanzen und Kapseln getrennt ausgewertet, so daß eine Varianzanalyse der Ergebnisse möglich ist. Diese Auszählungen wurden bereits im 1. Teil verwendet, um die Variabilität innerhalb einer Aufzucht zu untersuchen. Die entsprechenden Daten sind dort aus Tabelle 8 zu entnehmen.

Die Auswertung muß einen etwas verschiedenen Weg gehen, je nachdem, ob beide Aufzuchten den gleichen Umfang haben oder verschieden groß sind. In 9 Fällen standen für beide Jahre die gleiche Anzahl von Pflanzen, meist 10 mit je 5 Kapseln, zur Verfügung (Tabelle 2), in den übrigen 7 Fällen hatten eine oder beide Aufzuchten einen anderen Umfang

Tabelle 2. Jahresvergleich, vollständige Daten

Sorte	M %			Varianz				
	1.	2.	3.	Zwischen Jahren (1)	zwischen Kapsel- stellun- gen (4)	Jahre × Kap- seln (4)	Zwischen Pflanzen innerhalb der Jahre (18)	Rest (72)
e. biennis München . . .	11,84	5,22	8,53	1 172,2 ^a	8,3	4,4	32,2	15,1 ^b
iennis München × bien- nis apelata erweitert . .	4,34	0,52	2,43	2 263,9 ^a	10,9	4,9	15,7 ^a	11,9
iennis München × suaveolens sulfurea . .	53,14	85,26	69,20	11 780,9 ^a	23,5	16,3	141,0 ^a	21,4 ^b
iennis Hannover	10,24	7,08	8,66	235,6 ^a	8,1	19,3	24,9	10,4
iennis Hannover × suaveolens gelb	32,94	89,80	61,37	24 038,9 ^a	22,3	29,2	55,6 ^a (12)	18,9 ^b (48)
iennis apetalata cruciat × suaveolens sulfurea (c) .	56,56	87,16	71,86	10 922,3 ^a	15,5	11,6	49,1	28,2 ^b
iennis apetalata cruciat × Cockerelli	58,46	87,50	72,98	9 710,1 ^a	3,8	23,1	32,7 ^a	14,5 ^b
iennis apetalata erweitert × suaveolens gelb	56,34	84,16	70,25	8 295,6 ^a	0,5	16,4 ^a	45,9 ^a	1,1 ^b
suaveolens gelb × suaveolens sulfurea . .	71,86	79,90	75,88	960,4 ^a	49,3	42,0	109,0 ^a	39,7 ^b

^a = gesichert gegen Restvarianz der Sorte mit $P < 0,01$; ^b = gesichert gegen Zufallsvarianz $V_{\varphi} = 8,21$ mit $P < 0,01$; ^c = 1. und 2. Aufzucht. Ziffer in () = Anzahl der Freiheitsgrade.

(Tabelle 3). Für die zuerst genannten Sorten setzt sich die Analyse der Freiheitsgrade wie folgt zusammen. Jede Kapsel ist eindeutig einem Aufzuchtjahr und einer Stellung an der Infloreszenz zuzuweisen, ebenso einer bestimmten Pflanze, aber die Pflanzen sind in beiden Jahren nicht identisch, so daß alle Wechselwirkungen, bei denen die Pflanzen gewertet werden müßten, nicht berechnet werden können. Die Berechnungen werden daher als „unvollständige Varianzanalyse“ angelegt (MATHER 1948). Die Anzahl der Freiheitsgrade für die einzelnen Varianzkomponenten ist in der Tabelle 2 bei den verschiedenen Sorten angegeben. Für die restlichen 7 Sorten, bei denen in jedem Jahr eine andere Anzahl von Pflanzen und vor allem eine andere Anzahl von Kapseln je Pflanze ausgewertet wurde, kann die Analyse nicht so weit durchgeführt werden, ohne Ungenauigkeiten in die Berechnungen zu bringen. Die Gesamtvariabilität kann jedoch ohne Schwierigkeiten zerlegt werden in die beiden Anteile „zwischen den Jahren“ und „innerhalb der Jahre“ (Tabelle 3), was für das hier angestrebte Ziel auch genügt.

Da jede einzelne Probe aus 100 Samen bestand und wieder mit der Winkeltransformation der Prozentwerte gerechnet wurde, ist in beiden Tabellen der Vergleich der Restvarianz mit der theoretischen Zufallsstreuung von Proben dieses Umfangs möglich.

Aus der 1. Tabelle ist zu entnehmen, daß zwischen den Kapselstellungen keine Differenzen vorhanden sind, was nur eine Bestätigung der früheren Befunde bedeutet. Ebenso ist die Wechselwirkung „Kapselstellung × Jahre“ in keinem Fall gesichert. Eine Differenz zwischen den beiden Jahren ist in allen Fällen vorhanden, nur ist ihr Ausmaß bei den einzelnen Sorten sehr verschieden groß. Die Werte der Tabelle 3 zeigen ebenfalls, daß die Streuung zwischen den Vergleichsjahren größer ist als innerhalb eines jeden Jahres.

Für 7 weitere Sorten lagen für ein oder mehrere Jahre nur summarische Auszählungen einer größeren Samenzahl vor. Hier ist ein Vergleich zwischen den Ergebnissen mehrerer Jahre mit Hilfe des χ^2 -Testes möglich, wobei jedoch der Vergleich der Variabilität „zwischen“ und „innerhalb“ der Jahre entfällt. In allen Fällen sind die Unterschiede erheblich und gehen weit über das Maß zufälliger Streuung hinaus (Tabelle 4).

Tabelle 3. Jahresvergleich, unvollständige Auswertung

Sorte	M %			V zwischen Jahren	V in Jahren = Rest	F = V_J/V_R	F = V_R/V_Φ
	1.	2.	3.				
Oe. biennis A ₂ a × biennis							
apetala cruciat	6,40	0,53		3342,4	19,7	169,5 ^a	2,4
biennis apetala cruciat	2,98	10,17		1274,9	28,5	44,8 ^a	3,5
biennis apetala cruciat ×							
biennis apetala erweitert . . .	14,88	5,16		3800,7	80,6	47,2 ^a	9,8 ^a
biennis apetala cruciat ×							
suaveolens sulfurea	56,56	87,16	34,44	15757,4	128,6	122,5 ^a	15,7 ^a
biennis apetala erweitert ×							
biennis München	14,64	2,80		5004,1	21,7	231,0 ^a	2,6
biennis apetala erweitert	4,78	4,20		34,8	13,3	2,6	1,6
biennis apetala erweitert ×							
Cockerelli	60,36	80,05		3785,2	28,2	134,3 ^a	3,4 ^a
chicaginensis × strigosa	2,34	15,60		4344,4	87,7	49,5 ^a	10,7 ^a

^a = gesichert mit $P < 0,01$.

Tabelle 4. Vergleich von Aufzuchten in verschiedenen Jahren (χ^2 -Test; summarische Auswertung ohne Berücksichtigung der Differenzen innerhalb der Jahre)

Sorte	M in % tauber Samen	Anzahl der Samen	χ^2	P
Oe. biennis Hannover × strigosa	77,21 5,7 32,9 18,5	750 767 1112 1625	213,58	< 0,001
biennis Hannover × Cockerelli	68,3 6,5	3000 5000	> 1000	< 0,001
biennis Hannover × chicaginensis	67,4 6,8	3000 5000	> 1000	< 0,001
biennis apetala erweitert × suaveolens sulfurea .	74,9 55,6	4919 5000	> 300	< 0,001
biennis apetala erweitert × Cockerelli	64,1 60,4 80,1	4250 5000 4000	> 1000	< 0,001
(suaveolens sulfurea × strigosa) albata	12,0 ¹ 89,8 16,4 7,9	200 1164 4247 3800	> 1000	< 0,001
(suaveolens sulfurea) albata × Cockerelli	48,0 3,3	3000 3000	> 1000	< 0,001

¹ Aus: HARTE (1942).

b) Vergleich der Streuung in verschiedenen Jahren. Jede Aufzucht ist jedoch nicht nur durch ihren Mittelwert charakterisiert, sondern auch noch durch die Streuung der Einzelwerte um diesen Mittelwert. Eine Differenz in diesem Punkt wird durch die Varianzanalyse nicht erfaßt. Wenn aber die Endanalysen, die im I. Teil für jede Aufzucht getrennt durchgeführt wurden, miteinander verglichen werden, ist es möglich, für jede Variabilitätskomponente als Quotient der beiden, einander entsprechenden Varianzen einen F -Wert zu bilden, wobei dann aus dem zugehörigen P zu entnehmen ist, mit welcher Wahrscheinlichkeit beide Varianzen als zufällig differierende Schätzungen eines gemeinsamen Wertes aufzufassen

Tabelle 5. Vergleich der Varianzen der einzelnen Variabilitätskomponenten in den verschiedenen Versuchsjahren

Sorte	Total			Zwischen Kapseln			Zwischen Pflanzen			Rest		
	N	V	F	n	V	F	n	V	F	n	V	F
ennis München. . .	49	23,9	2,1 ^a	4	3,3	2,9	9	45,3	2,4	36	20,8	2,2
	49	11,2		4	9,4		9	19,2		36	9,4	
s München × bien-												
apetala erweitert . .	49	10,4	1,2	4	3,7	3,3	9	19,2	1,4	36	10,3	1,3
	49	13,2		4	12,2		9	12,1		36	13,6	
s München ×												
reolens sulfurea . .	49	20,3	3,3 ^a	4	15,1	1,6	9	28,0	9,1 ^a	36	19,0	1,2
	49	66,1		4	24,7		9	254,0		36	23,7	
s Hannover	49	18,2	2,1 ^a	4	15,5	1,3	9	37,7	3,1	36	13,6	1,9
	49	8,5		4	11,9		9	12,3		36	7,2	
s Hannover ×												
reolens gelb	49	28,4	1,2	4	38,3	2,9	9	50,1	1,2	36	21,3	1,3
	49	24,0		4	13,2		9	61,1		36	16,5	
s A ₂ a × biennis												
ala cruciat	49	24,7	1,8	9	62,7	1,4	4	22,9	3,7	36	15,4	1,5
	44	14,0		3	87,1		14	6,1		27	9,9	
s apetala cruciat . .	49	16,1	3,1 ^a	4	20,4	2,3	9	15,9	7,0	36	15,7	2,8 ^a
	29	49,4		9	47,1		2	111,7		18	43,5	
s apetala cruciat ×												
nis apetala erweitert	49	61,7	1,6	4	14,5	1,5	9	209,6	4,4	36	29,9	1,0
	49	99,5		9	21,3		4	913,5		36	28,6	
s apetala cruciat ×												
reolens sulfurea . .	49	19,2	2,2 ^a	4	13,4	1,0	9	35,3	1,8	36	15,8	2,6 ^a
	49	42,5	16,9 ^a	4	13,7	4,5	9	62,9	92,9 ^a	36	40,6	3,9 ^a
	49	324,1	7,6 ^a	9	60,0	4,4	4	3278,1	52,1 ^a	36	61,9	1,5
s apetala cruciat ×												
kerelli	49	18,2	1,1	4	11,9	1,3	9	28,5	1,3	36	16,4	1,3
	49	17,3		4	15,1		9	36,9		36	12,6	
s apetala erweitert ×												
nis München	49	14,9	1,9	4	8,3	6,8	9	40,6	3,9	36	9,4	1,4
	49	28,3		9	56,5		4	158,1		36	6,9	
s apetala erweitert .	49	8,7	2,2 ^a	4	0,9	32,4 ^a	9	27,3	1,2	36	4,9	2,9 ^a
	39	19,1		9	29,9		3	31,8		27	14,1	
s apetala erweitert ×												
reolens gelb	49	19,1	1,2	4	6,9	1,5	9	58,8	1,8	36	10,6	2,1
	49	23,2		4	10,0		9	33,0		36	22,2	
s apetala erweitert ×												
kerelli	49	10,3	4,9 ^a	4	4,6	9,7	9	6,0	9,3 ^a	36	12,1	4,5 ^a
	39	50,6		14	44,7		3	55,7		22	53,8	
s gelb ×												
reolens sulfurea . .	49	20,7	4,1 ^a	4	35,5	1,6	9	43,0	4,1	36	13,5	4,9 ^a
	49	85,1		4	55,8		9	175,0		36	65,9	
inensis × strigosa	49	27,4	5,9 ^a	4	19,8	1,3	9	63,2	13,6 ^a	36	19,2	1,8
	39	163,5		4	15,9		7	858,6		28	10,8	

= gesichert mit $P < 0,01$.

sind. Dieser Vergleich ist für alle 16 Sorten in Tabelle 5 dargestellt. Obgleich auf den ersten Blick die Differenzen oft ziemlich groß erscheinen, sind diese nur

Tabelle 6. Vergleich zwischen Normal- und Mangelkulturen des gleichen Jahres. Übersicht über das Material

Sorte	Behandlung	Anzahl der			Tauben Samen in %	
		Pflanzen	Kapseln	Samen	M	Extremwerte der Pflanze
Oe. biennis München × biennis Hannover	normal	10	50	5000	8,36	6,8—10,4
	Mangel	2	25	1244	17,60	15,6—25,8
biennis München × biennis apetala erweitert	normal	10	50	5000	4,34	2,6— 6,2
	Mangel	1	6	500	15,80	—
biennis München × suaveolens sulfurea	normal	10	50	5000	53,14	48,4—60,4
	Mangel	3	19	1454	60,04	52,6—72,9
biennis A ₂ a × biennis Hannover	normal	10	50	5000	7,36	2,2—12,2
	Mangel	2	30	2000	10,40	7,9—12,9
biennis A ₂ a × suaveolens sulfurea	normal	10	50	5000	54,52	48,4—62,4
	Mangel	2	13	1037	62,19	60,2—64,1
biennis A ₂ a × strigosa	normal	10	50	5000	8,78	5,2—13,2
	Mangel	2	21	2026	9,28	7,3—11,1
biennis A ₂ a × Cockerelli	normal	10	50	5000	57,40	52,4—63,0
	Mangel	2	30	1968	60,06	54,1—65,8
biennis apetala cruciat × biennis Hannover	normal	10	50	5000	11,36	8,8—13,2
	Mangel	1	12	1000	43,90	—
biennis apetala cruciat × suaveolens sulfurea	normal	10	50	5000	56,56	48,2—63,2
	Mangel	2	33	2032	56,20	45,0—68,2
biennis apetala cruciat × strigosa	normal	10	50	5000	8,56	6,6—10,4
	Mangel	2	40	3838	9,01	7,8—10,1
biennis apetala cruciat × Cockerelli	normal	10	50	5000	58,46	49,8—64,8
	Mangel	4	75	5308	48,78	22,2—70,9

in relativ wenigen Fällen gesichert. Bei 7 Sorten ist die Variabilität, die durch die Differenzen zwischen den Pflanzen und zwischen den Kapselstellungen gegeben ist, in beiden Aufzuchtjahren gleich groß, auch wenn die Mittelwerte verschieden sind.

Von den 9 Sorten, bei denen die Gesamtstreuung in beiden Jahren gesichert verschieden ist, ist nur in einem Fall die Streuung zwischen den Kapseln einer Infloreszenz hierfür die Ursache. Bei 3 Sorten ist die Streuung zwischen den Pflanzen in einem Jahr größer als im anderen; in den übrigen 5 Fällen liegt die Ursache dagegen in der Reststreuung. Hier ist die Wechselwirkung Kapsel × Pflanze in beiden Jahren verschieden. Beide Punkte zusammen bedeuten aber, daß in einem Jahr die Pflanzen einheitlicher reagierten als im anderen, unter der Wirkung unbekannter, zusätzlicher Variationsursachen, die in beiden Jahren differierten.

II. Untersuchung der Wirkung von Mangelkultur

a) Vergleich der Pflanzen. Von diesen Pflanzen, deren Aufzuchtbedingungen oben beschrieben wurden, standen nur selten 100 Samen je Kapsel für die Aus-

Tabelle 7. Prüfung der Unterschiede zwischen Pflanzen und zwischen Stellung der Kapseln an der Infloreszenz bei den Mangelkulturen

Sorte	Variationsursache	χ^2	n	P
Oe. biennis A ₂ a × biennis Hannover	total	23,824	3	< 0,001
	zwischen Pflanzen	13,416	1	< 0,001
	zwischen Stellung	10,388	1	< 0,01
	Zufall	0,020	1	> 0,05
biennis A ₂ a × strigosa	total	25,844	3	< 0,001
	zwischen Pflanzen	8,660	1	< 0,01
	zwischen Stellung	9,210	1	< 0,01
	Zufall	7,974	1	< 0,01
biennis A ₂ a × Cockerelli	total	398,801	3	< 0,001
	zwischen Pflanzen	27,924	1	< 0,001
	zwischen Stellung	258,374	1	< 0,001
	Zufall	112,503	1	< 0,001
biennis apetala cruciat × suaveolens sulfurea	total	162,670	3	< 0,001
	zwischen Pflanzen	110,915	1	< 0,001
	zwischen Stellung	24,901	1	< 0,001
	Zufall	26,854	1	< 0,001
biennis apetala cruciat × strigosa	total	11,228	3	< 0,05
	zwischen Pflanzen	6,559	1	
	zwischen Stellung	4,832	1	> 0,05
	Zufall	0,000	1	
biennis apetala cruciat × Cockerelli	total	633,324	7	< 0,001
	zwischen Pflanzen	613,408	3	< 0,001
	zwischen Stellung	13,809	1	< 0,001
	Zufall	6,107	3	0,2—0,1

zählung zur Verfügung, meist nur 50 oder eine wechselnde Anzahl. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über das Material. An jeder Pflanze wurden die ersten 5—10 und, wenn die Größe der Infloreszenz dies gestattete, nochmals die letzten Blüten geselbstet. Wenn möglich, wurden von jeder dieser beiden Gruppen 500 Samen nach Kapseln getrennt ausgezählt. Da durch die geringen Samen-zahlen je Kapsel die Zufallsstreuung sehr groß ist, ist ein Nachweis von Differenzen zwischen den Kapseln erschwert. Auch wenn hierbei mit den Prozentwerten eine Winkeltransformation durchgeführt wird, haben doch alle Werte eine verschiedene Streuung, so daß eine Varianzanalyse der Ergebnisse nicht möglich ist. Es wurde deshalb auf eine ins einzelne gehende Analyse verzichtet und innerhalb jeder Pflanze nur die Gruppe der ersten und letzten Kapseln einander gegenübergestellt, da angenommen werden kann, daß die letzten Blüten unter noch extremeren Mangelbedingungen angelegt wurden als die ersten. Für die Auswertung wurde der χ^2 -Test herangezogen, weil dieser die Möglichkeit gibt, den verschiedenen Umfang der einzelnen Proben zu berücksichtigen.

Zwischen beiden Gruppen wurde die Homogenität der Verteilung auf taube und keimhaltige Samen geprüft. Wenn mehrere Pflanzen mit je 2 Gruppen von Kapseln vorhanden sind, ist eine χ^2 -Zerlegung möglich, wobei von der Gesamtvariabilität die Komponenten „zwischen Pflanzen“ und „zwischen Kapselstellungen“ abgetrennt werden und ein Rest übrigbleibt, der wieder die Wechselwirkung enthält. Für jede dieser Komponenten kann unter Berücksichtigung der Anzahl der Freiheitsgrade geprüft werden, ob sie noch als Zufallsvariable angesehen werden kann oder nicht. Darüber hinaus ist aus χ^2/n die Berechnung einer Varianz möglich, um zu testen, ob der relative Einfluß der verschiedenen Variationsursachen unterschiedlich ist.

Tabelle 8. Prüfung der Differenz zwischen Normal- und Mangelkultur, Endanalysen zu
Tabelle 6

Sorte	Variationsursache	χ^2	n	P	V	F	
Oe. biennis München × biennis Hannover . .	total	122,748	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	92,928	1	< 0,001	92,9	31,18	<
	zwischen Pflanzen	29,820	10	< 0,001	3,0		
	zwischen Normalpflanzen	7,999	9	0,7—0,5	0,9	15,90	<
	zwischen Mangelpflanzen	14,123	1	< 0,001	14,1		
biennis München × bien- nis apetala erweitert .	zwischen Sorten	21,629	1	< 0,001			
biennis München × suaveolens sulfurea .	total	96,820	12				
	zwischen Gruppen	21,650	1	< 0,001	21,7	3,17	>
	zwischen Pflanzen	75,169	11	< 0,001	6,8		
	zwischen Normalpflanzen	29,894	9	< 0,001	3,3	20,95	<
	zwischen Mangelpflanzen	139,144	2	< 0,001	69,6		
biennis A ₂ a × biennis Hannover	total	66,338	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	17,484	1	< 0,001	17,5	3,57	>
	zwischen Pflanzen	48,854	10	< 0,001	4,9		
	zwischen Normalpflanzen	35,773	9	< 0,001	4,0	3,37	>
	zwischen Mangelpflanzen	13,414	1	< 0,001	13,4		
biennis A ₂ a × suaveo- lens sulfurea	total	64,406	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	20,535	1	< 0,001	20,5	4,68	>
	zwischen Pflanzen	43,871	10	< 0,001	4,4		
	zwischen Normalpflanzen	42,076	9	< 0,001	4,8	2,91	>
	zwischen Mangelpflanzen	1,642	1	0,2	1,6		
biennis A ₂ a × strigosa . .	total	72,428	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	0,443	1	0,7—0,5	0,4	16,25	>
	zwischen Pflanzen	71,985	10	< 0,001	7,2		
	zwischen Normalpflanzen	63,951	9	< 0,001	7,1	1,22	>
	zwischen Mangelpflanzen	8,656	1	< 0,01	8,7		
biennis A ₂ a × Cockerelli .	total	47,700	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	4,113	1	0,05—0,02	4,1	1,06	>
	zwischen Pflanzen	43,586	10	< 0,001	4,4		
	zwischen Normalpflanzen	15,999	9	0,1—0,05	1,8	15,69	<
	zwischen Mangelpflanzen	27,912	1	< 0,001	27,9		
biennis apetala cruciat × biennis Hannover . .	zwischen Sorten	632,015	1	< 0,001			
biennis apetala cruciat × suaveolens sulfurea .	total	148,735	11	< 0,001			
	zwischen Gruppen	0,077	1	0,8—0,7	0,1	192,30	>
	zwischen Pflanzen	148,658	10	< 0,001	14,9		
	zwischen Normalpflanzen	37,668	9	< 0,001	4,2	2,65	>
	zwischen Mangelpflanzen	110,885	1	< 0,001	110,9		
biennis apetala cruciat × strigosa	total	14,442	11	0,3—0,2			
	zwischen Gruppen	0,562	1	0,5—0,3	0,6	2,47	>
	zwischen Pflanzen	13,880	10	0,2—0,1	1,4		
	zwischen Normalpflanzen	7,298	9	0,7—0,5	0,8	8,09	>
	zwischen Mangelpflanzen	6,558	1	0,02—0,01	6,6		
biennis apetala cruciat × Cockerelli	total	744,592	14	< 0,001	53,2		
	zwischen Gruppen	96,628	1	< 0,001	96,6	1,93	>
	zwischen Pflanzen	647,964	13	< 0,001	49,8		
	zwischen Normalpflanzen	7,336	9	0,7—0,5	3,3	62,11	<
	zwischen Mangelpflanzen	615,439	3	< 0,001	205,2		

In 4 von den 5 Fällen sind die Unterschiede zwischen den Pflanzen und zwischen den Abschnitten der Infloreszenz gesichert, aber zugleich liegt die Restvariabilität in der gleichen Größenordnung (Tabelle 7). Die Betrachtung der Versuchsdaten zeigt zudem, daß sowohl ein Ansteigen wie eine Verminderung zum Ende der Infloreszenz hin möglich ist. Damit ist erwiesen, daß bei den Mangelpflanzen grundsätzlich die gleichen Verhältnisse gegeben sind wie bei den Normalpflanzen.

b) Vergleich zwischen Normal- und Mangelpflanzen. Der Vergleich zwischen Normal- und Mangelpflanzen wurde ebenfalls aus den genannten Gründen als χ^2 -Test durchgeführt unter Vernachlässigung der Kapseldifferenzen (Tabelle 6 und 8). Die Normalkulturen sind dieselben, die im 1. Teil (HARTE 1958) besprochen wurden.

An Hand des Bastards *Oe. (biennis apetala cruciat* $\times$ *Cockerelli*) *albicans-cr₁ elongans*, von dem 10 Normalpflanzen und 4 Mangelpflanzen vorhanden sind, läßt sich die Analyse am besten erläutern. Die Größe χ^2 -total zeigt mit $P < 0,001$ an, daß die Differenzen zwischen den einzelnen Pflanzen größer sind, als bei dem gegebenen Umfang des Materials zufällig möglich ist. Die Berechnung des χ^2 „zwischen den Gruppen“ ergibt dann eine gesicherte Differenz zwischen Normal- und Hungerpflanzen. Die übrigbleibende Größe χ^2 „zwischen Pflanzen innerhalb der Gruppen“ zeigt aber durch $P < 0,001$, daß damit nicht alle Variabilitätsursachen erfaßt wurden. Nach der Berechnung der Varianzen beweisen die *F*-Werte, daß durch die Elimination der Differenzen zwischen den Gruppen die Variabilität nicht nennenswert verkleinert wurde. Die Unterschiede zwischen Normal- und Mangelkultur können also bei der Entstehung der Differenzen zwischen den Pflanzen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die getrennte Berechnung des χ^2 für die Homogenität innerhalb einer jeden Gruppe und der zugehörigen Varianzen zeigt aber mit $P < 0,001$, daß innerhalb der Normalgruppe die Variabilität wesentlich geringer ist als innerhalb der Versuchsgruppe. Durch die Mangelkultur wurden also die Differenzen zwischen den Pflanzen verstärkt. Die Unterschiede der Mittelwerte beider Gruppen kommen durch die zufällige Kombination einer kleinen Anzahl dieser stark variierenden Pflanzen zustande, ohne daß sie etwas über die wahren Differenzen aussagen. Für alle anderen Sorten gilt das gleiche. Bei allen ergeben sich sehr gut gesicherte Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, wenn jedoch die Werte der Einzelpflanzen betrachtet werden, zeigt es sich, daß die Differenzen zwischen beiden Gruppen nicht größer sind als die Unterschiede, die innerhalb der Normalgruppe auftreten. Die Variationsbereiche sind nicht wesentlich verschieden. Die Berechnung der Varianzen und daraus der *F*-Werte zeigt keine Verminderung der Variabilität durch die Berücksichtigung der Differenz „zwischen den Gruppen“. Die Versuchsdaten hierzu sind in Tabelle 6, die Endanalysen in Tabelle 8 zusammengestellt.

D. Diskussion

Die Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Umweltbedingungen zeigen 2 Punkte auf. In den Vergleichsjahren liegen die Mittelwerte für den Gehalt an tauben Samen auch unter Berücksichtigung der Differenzen innerhalb der Jahre gesichert verschieden. Der ihrer Entstehung zugrunde liegende Vorgang der

Gonenkonkurrenz muß also unter den Bedingungen der verschiedenen Aufzuchten ein unterschiedliches Ausmaß gehabt haben. Die Richtung der Veränderungen liegt jedoch für ähnliche Komplexkombinationen, die in denselben Jahren aufgezogen wurden, nicht in der gleichen Richtung. Die beiden Bastarde *'albicans H' stringens* und *'albicans' stringens*, die in 4 Jahren nebeneinander untersucht wurden, zeigen z. B. ganz verschiedenartige Veränderungen in der Häufigkeit, mit der *stringens* in den Eizellen auftritt, von fast völliger Verdrängung bis zu deutlichem Überwiegen über die ursprünglichen „Eizellenkomplexe“ *albicans*. Für die übrigen Komplexkombinationen zeigt sich die gleiche Erscheinung. Ganz ähnliche Verbindungen können in den beiden Vergleichsjahren Differenzen zeigen, die in verschiedener Richtung liegen, wie aus den Tabellen zu entnehmen ist, in denen die Mittelwerte in der Reihenfolge der Aufzuchtjahre gegeben sind. Es ist also sicher nicht so, daß die Bedingungen in einem Jahr allgemein günstiger für einen bestimmten Komplex sind.

Auffallend ist vor allem die verschiedene Streuung in vielen Vergleichspaaren. Mit den in verschiedenen Jahren differierenden Bedingungen, deren nähere Natur nicht bekannt ist und die die Verschiebung der Mittelwerte bewirken, sind also nicht alle Variationsursachen erfaßt. Die Unterschiede der Umwelt wirken auch noch in der Weise, daß die Pflanzen sehr verschieden anfällig werden für weitere Einflüsse. In einem Jahr reagieren fast alle Pflanzen einer Sorte einheitlich, im anderen liegen die Einzelwerte weit auseinander. Aber auch hier ist es nicht so, daß in einem bestimmten Jahr die Variabilität allgemein größer ist als in einem anderen, sondern jede Sorte verhält sich wieder anders.

Bei den Mangelkulturen, bei denen die Umweltbedingungen in extremer Weise verändert sind, zeigt sich die Vergrößerung der Streuung gegenüber der normalen Vergleichsaufzucht als wichtigstes Versuchsergebnis. Beide Serien zusammen lassen die Deutung zu, daß die groben Veränderungen, die im Versuch geprüft wurden (Wetterverhältnisse, Temperatur und Feuchtigkeit im Jahresvergleich, Mineralsalz- und Wasserversorgung im Mangelversuch), den Vorgang der Gonenkonkurrenz zwar beeinflussen, aber nicht direkt im Sinne einer Förderung oder Hemmung bestimmter Komplexe, sondern in der Weise, daß hierdurch die Stabilitätslage der Pflanzen verändert wird und diese unter extremen Bedingungen anfälliger werden für die Faktoren, die letzten Endes auf dem Weg über die Mutterpflanze für die Schwankungen im Gehalt an tauben Samen, d. h. eigentlich für die zugrunde liegende Gonenkonkurrenz, verantwortlich sind, ohne daß diese Faktoren selber durch die Versuchsbedingungen erfaßt oder verändert wurden.

Zusammenfassung

1. Es wurden 22 Sorten von *Oenothera* in mehreren Jahren aufgezogen und der Gehalt an tauben Samen nach Selbstung der Pflanzen bestimmt. Für 7 Sorten liegen Vergleiche zwischen Normal- und Mangelkultur vor.
2. Zwischen den Aufzuchten in verschiedenen Jahren zeigen sich gesicherte Differenzen der Mittelwerte, in vielen Fällen dazu aber auch Unterschiede in der Streuung zwischen den Pflanzen.
3. Die Unterschiede zwischen Normal- und Mangelkultur sind nicht größer, als bei den stark variierenden Werten der Einzelpflanzen erwartet werden kann.

Die Mangelpflanzen zeigen aber unter sich größere Differenzen als die Normalpflanzen.

4. Es gibt also (im einzelnen unbekannte) Außenbedingungen, die die Gonenkonkurrenz im Sinne einer Förderung eines Komplexes verändern können und sich in der Verschiebung der Mittelwerte anzeigen, aber extreme Veränderungen bewirken vor allem eine erhöhte Labilität der Einzelpflanzen, so daß sie anfälliger werden und auf die eigentlich für die Unterschiede der Gonenkonkurrenz zwischen verschiedenen Fruchtknoten einer Pflanze und zwischen verschiedenen Pflanzen verantwortlichen Faktoren mit größeren Ausschlägen reagieren.

Literatur

HARTE, C.: Meiosis und crossing-over. Weitere Beiträge zur Cytogenetik von *Oenothera*. Z. Bot. **38**, 65—137 (1942). — HARTE, C.: Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. I. Die individuelle Komponente der Variabilität. Z. Vererb.-Lehre **89**, 473—496 (1958), dort weitere Literaturangaben. — MATHER, K.: Statistical analysis in biology. Methuen & Co., London 1949.

Prof. Dr. CORNELIA HARTE,
Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln,
Köln-Lindenthal (Rhein), Gyrhofstr. 17

Aus dem Zoologischen Institut Bonn

ENTWICKLUNG UND LAGE DER AUGENPIGMENTE BEI VERSCHIEDENEN DROSOPHILAMUTANTEN*

Von

BRIGITTE ZEUTZSCHEL

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. April 1958)

Das Augenpigment der Wildrasse von *Drosophila melanogaster* besteht, wie schon seit langem bekannt ist, aus einer braunen und einer roten Komponente. Der *braune Augenfarbstoff* wird unter der Mitwirkung der Gene v^+ und cn^+ aus Tryptophan über Kynurenin und 3-Oxykynurenin gebildet und gehört zu den Ommochromen (BUTENANDT et al. 1949).

Bei der Mutante „*vermilion*“, die an Stelle des Gens v^+ das Allel v führt, kann Tryptophan nicht in Kynurenin übergeführt werden, während bei der Mutante „*cinnabar*“ (cn) die Umwandlung von Kynurenin in Oxykynurenin gestört ist. Die Fliegen dieser beiden Rassen sind rein rotäugig, da sie das braune Augenpigment nicht zu bilden vermögen.

Über die Natur des *roten Augenfarbstoffs*, der wahrscheinlich zu den Pteridinen gehört, ist wenig bekannt. Seine Bildung ist an das Gen bw^+ gebunden; Tiere der Rasse „*brown*“, die das mutierte Gen bw führen, haben daher rein braune Augen. Bei den doppelt rezessiven Mutanten vbw und $cnbw$ kann weder die rote noch die braune Pigmentkomponente entstehen; diese Fliegen sind deshalb weißäugig.

Die Mutante „*sepia*“ (se) bildet statt des roten *einen gelben Farbstoff*, der auch bei der Wildrasse und den rotäugigen Mutanten v und cn in geringer Menge vorhanden ist, bei bw -Fliegen und bei den weißäugigen vbw - und $cnbw$ -Tieren aber fehlt (DANNEEL und ESCHRICH 1956).

Die Fliegen der Rasse „*white*“ (w) haben *farbloze Augen* wie die vbw - und $cnbw$ -Tiere, obwohl sie, wie EPHRUSSI und CHEVAIS (1938) durch Transplantationsversuche nachweisen konnten, sowohl Kynurenin als auch Oxykynurenin zu bilden vermögen. Das gleiche gilt für die ebenfalls weißäugige Mutante „*wa*“ von *Ephesia Kühniella*. Wie HANSER (1948) nachweisen konnte, fehlen hier aber die Trägergranula, an denen sich die letzten, strukturgebundenen Vorgänge der Pigmentbildung vollziehen. Danach lag der Gedanke nahe und ist auch geäußert worden, daß das Gen w von *Drosophila* dem Gen wa von *Ephesia* homolog sei und ebenfalls einen Ausfall der Trägersubstanz bewirke. Zur Klärung dieser Frage soll der letzte Teil der vorliegenden Untersuchungen beitragen.

Die Anregung zu dieser Arbeit verdanke ich Herrn Professor Dr. R. DANNEEL. Bei den elektronenoptischen Aufnahmen half mir Herr Dr. WOHLFARTH-BOTTERMANN.

Material und Methoden

Die folgenden Untersuchungen erstrecken sich auf die Komplexaugen von Fliegen und Puppen der *Drosophil*arassen $+$, bw , v , cn , se , se , se , cn , vbw , $cnbw$ und w .

* Herrn Professor Dr. Dr. A. REICHENSBERGER zum 80. Geburtstag gewidmet.

sowie auf die Stirnocellen von *+* und *bw*-Tieren. Das Material stammte aus Institutszuchten, die bei 25° gehalten wurden.

Zur Fixierung der Köpfe von Fliegen und Puppen der gefärbten Rassen verwendet man wegen der leichten Wasserlöslichkeit des roten Pigments zweckmäßigerweise das Gemisch von CARNOY oder reinen absoluten Alkohol und streckt nicht auf Wasser, sondern auf Anilin. Ungefärbte Augen kann man unter anderem auch mit einer 1%igen Lösung von Osmiumtetroxyd fixieren und mit Hämatoxylin nach SCHULTZE färben. Nach der Fixierung mit absolutem Alkohol eignet sich die Färbung mit Hämatoxylin nach R. HEIDENHAIN. In vielen Fällen genügt aber auch die Untersuchung ungefärbter Schnitte von etwa 3–4 μ Dicke.

Für die Untersuchung im Elektronenmikroskop wurden Augen von Fliegen der Rassen *w*, *cnbw*, und *sev* in isotonischer, auf pH 7.2 gepufferter Lösung von Osmiumtetroxyd 4 Std lang bei 0° fixiert und anschließend 1 Std lang in Tyrodelösung ausgewaschen (PALADE 1952, RHODIN 1954). Dann wurden sie in steigendem Alkohol entwässert und in einem Gemisch von Methyl- und Butylmethacrylat eingebettet.

Ergebnisse

1. Lage und Bau der Pigmentzellen

Das Augenpigment der Insekten liegt in Form von kleinen Körnern in besonderen Pigmentzellen, die die einzelnen Ommatidien umhüllen, aus denen die Komplexaugen zusammengesetzt sind (Abb. 1).

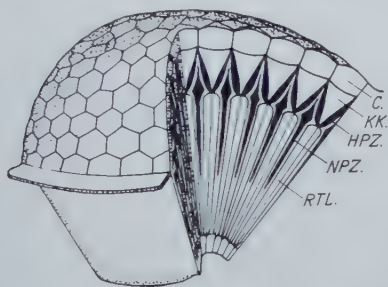


Abb. 1. Bau eines Komplexauges (nach KÜHN, etwas verändert). C. Cornea, KK. Kristallkegel, HPZ. Hauptpigmentzellen, NPZ. Nebenpigmentzellen, RTL. Retinulazellen

Abb. 2. Schematischer Längsschnitt durch ein Ommatidium. Bsm Basalmembran, Cor Cornea, Hpz Hauptpigmentzelle, Npz Nebenpigmentzelle, Psc Pseudoconus, Rhb Rhabdom, Rtk Retinulakern, Sz Sehzelle

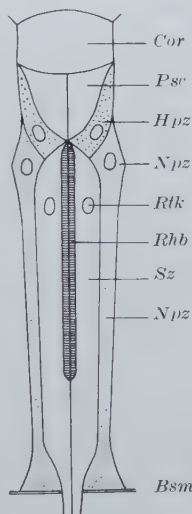


Abb. 2

Die Komplexaugen von *Drosophila* enthalten 2 Sorten von Pigmentzellen, und zwar besitzt jedes Ommatidium 2 „Hauptpigmentzellen“, die den Pseudoconus becherartig einschließen, und 9 „Nebenpigmentzellen“, die die Retinulazellen umgeben und den jeweils benachbarten Ommatidien gemeinsam angehören (Abb. 2).

Die Angaben mancher Autoren weichen von dieser Beschreibung etwas ab. So erwähnt JOHANNSEN (1924) eine dritte Sorte von Pigmentzellen, die er „Basalpigmentzellen“ nennt. HERTWECK (1931) und COCHRANE (1937) bestreiten jedoch mit Recht die Existenz dieser Zellen. Es handelt sich nämlich lediglich um die verdickten, dicht mit Pigment angefüllten, basalen Enden der Nebenpigmentzellen, die niemals Kerne enthalten. Der einzige Kern,

der sich in der Nähe der Basalmembran befindet, liegt vielmehr innerhalb der Retinula und gehört zu der achten, stark reduzierten Retinulazelle. Die Nebenzellen machen ja während der Entwicklung des Auges eine Streckung durch, wobei der Kern mit einem Teil des Plasmas vom basalen an das distale Ende des Ommatidiums wandert (s. Abb. 5, 6 und 7). So entstehen die verdickten Distalenden der Nebenzellen. NOLTE (1950) beschreibt sogar 4 Arten von Pigmentzellen, und zwar wird seiner Meinung nach jedes Ommatidium umgeben von 2 Hauptpigmentzellen, 9 Nebenzellen, 9 Basalzellen und 1 Zelle, die man besser als subretinales Pigment bezeichnet, keine Kerne zugeordnet sind. Außerdem entsteht das erwähnte Pigment sicher nicht an dieser Stelle. Die subretinalen Pigmentkörner färben sich nämlich nicht allmählich aus, wie alle übrigen Granula, sondern treten sofort in fertig pigmentiertem Zustand auf, und zwar erst kurz vor dem Schlüpfen der Fliegen, wenn die Pigmentierung der Augen bereits nahezu beendet ist. Dementsprechend wiesen bei allen von mir untersuchten Rassen die basalen und subretinalen Pigmentkörner jeweils den gleichen Farbton auf.

Die Angaben über die Anzahl der Nebenzellen weichen ebenfalls voneinander ab. JOHANNSEN fand 12, HERTWECK nur 6, während NOLTE von 9 Nebenzellen spricht, ein Befund, den ich bestätigen kann.

2. Die Farbe der Pigmentkörner

Auf Schnitten durch *wildfarbige Drosophila*-Augen erkennt man deutlich, daß der braunrote Farbton auf dem Vorhandensein von drei verschiedenen Sorten von Pigmentkörnern beruht, nämlich ockergelben, hellroten und tief weinroten.

Augen von *v*- und *cn*-Fliegen, bei denen die Bildung der braunen Pigmentkomponente unterdrückt ist, enthalten ausschließlich die hellroten Pigmentkörner. Dieses Pigment ist also morphologisch einheitlich. Im Dunkelfeld leuchtet es allerdings an manchen Stellen grün, an anderen jedoch gelb bis orangegelb. Diese Erscheinung beruht aber nicht auf der Anwesenheit verschiedener Farbstoffe, sondern auf verschieden dichter Lagerung ein und desselben Pigments, und zwar ist gelbes Aufleuchten typisch für dicht pigmentierte Zonen, grünes für spärlich pigmentierte.

Die Augen von *bw*-Fliegen enthalten erwartungsgemäß nur die beiden anderen Sorten von Pigmentkörnern, nämlich ockergelbe und weinrote. Das braune Pigment ist also morphologisch nicht einheitlich. Aus Oxykynurenin gehen vielmehr im *Drosophila*-Auge zwei verschiedene Ommochrome hervor, deren Entstehung vielleicht auf der Existenz zweier verschiedener Sorten von Trägergranula beruht (KÜHN 1956). Auch im Dunkelfeld kann man deutlich sehen, daß das braune Pigment heterogen ist. Während nämlich die ockergelben Pigmentkörner hellgrün aufleuchten, zeigen die weinroten Pigmentkörner im Dunkelfeld ein schwaches Orange, in dichter Lagerung ein starkes Orangerot.

Chemisch verhält sich das weinrote Pigment wie das von BUTENANDT und seinen Mitarbeitern (1954) beschriebene Xanthommatin und läßt sich mit H_2O_2 zu einer gelbbraunen Stufe oxydieren.

3. Die Verteilung der Pigmente bei verschiedenen gefärbten Mutanten

a) *Das Pigment der Wildform.* Die Komplexaugen der Wildrasse von *Drosophila* enthalten, wie gesagt, ockergelbe, weinrote und hellrote Pigmentkörner

(Abb. 3a). Die ockergelben Pigmentkörner liegen ausschließlich in den Hauptpigmentzellen und bilden eine dünne Schale um den Pseudoconus. Die verdickten Distalenden der Nebenzpigmentzellen sind dagegen dicht mit hellroten Pigmentkörnern angefüllt, die nach unten hin (proximal) spärlicher werden und dann weinrotem Pigment Platz machen, das in den verdickten Basalenden der Nebenzpigmentzellen und in der subretinalen Pigmentzone besonders dichte Anhäufungen bildet.

Im Dunkelfeld leuchtet das Pigment der Hauptpigmentzellen grün, das der Nebenzpigmentzellen an den Distalenden gelb bis orange, entlang den Retinulazellen gelb bis gelbgrün und in der proximalen Zone orange. Die dichten basalen Pigmentanhäufungen leuchten stark orangerot.

b) *Das Pigment der Mutante bw.* Die bei *bw*-Tieren allein vorhandene Braunkomponente besteht, wie ich schon erwähnte, aus ockergelben und weinroten Pigmentkörnern (Abb. 3b). Die Menge des ockergelben Pigments ist dabei verhältnismäßig gering; es liegt wie bei der Wildrasse nur in den Hauptpigmentzellen. Die Nebenzpigmentzellen enthalten nur weinrotes Pigment. Ihre Distalenden sind, verglichen mit der Wildrasse, nur sehr schwach pigmentiert, da den *bw*-Tieren ja das hellrote Pigment fehlt. Auch die Pigmentschicht, die die Retinulazellen umgibt, ist dünner als bei den wildfarbigen

Augen, und nur an der Basis der Nebenzpigmentzellen bildet das weinrote Pigment die schon bei den $\pm$ -Fliegen beschriebenen dichten Anhäufungen.

Im Dunkelfeld leuchten die Pigmentkörner in den Hauptpigmentzellen grün. Die Farbe des spärlichen, die Retinulazellen umgebenden Pigmentmantels ist ein schwaches Orange, während die Pigmentanhäufungen in der basalen und subretinalen Pigmentzone hell orangerot aufleuchten.

Bei der Mutante *bw* werden also in den beiden Pigmentzelltypen zwei verschiedene Ommochrome gebildet, wohingegen die Rotkomponente ganz fehlt.

c) *Das Pigment der Mutanten v und cn.* Die Augen der *v*- und *cn*-Tiere unterscheiden sich histologisch nicht voneinander. Beide besitzen nur hellrote Pigmentkörner, deren Hauptmenge in den Distalenden der Nebenzpigmentzellen

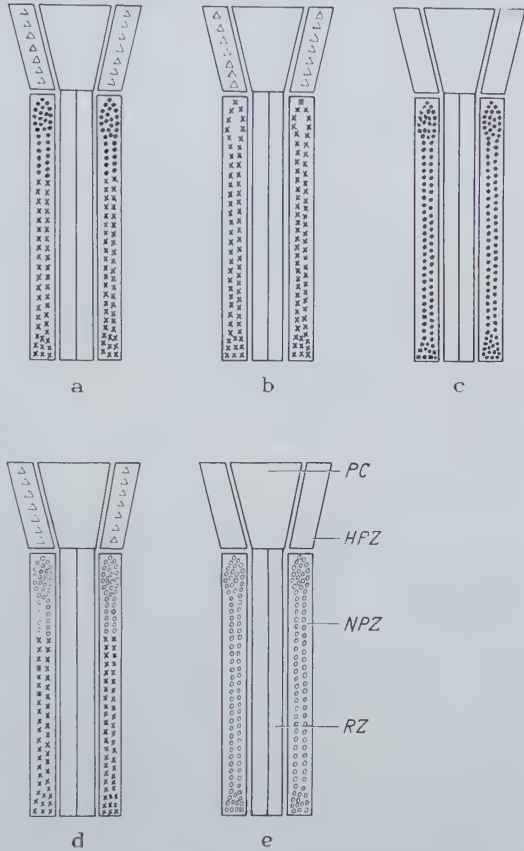


Abb. 3a—e. Schema der Pigmentverteilung bei den verschiedenen Rassen. a = $\pm$, b = *bw*, c = *v* und *cn*, d = *se*, e = *secn*. PC Pseudoconus, HPZ Hauptpigmentzelle, NPZ Nebenzpigmentzelle, RZ Retinulazelle. Δ = ockergelb, × = weinrot, ● = hellrot, ○ = gelb

liegt (Abb. 3c). Die Retinulazellen sind nur von einer dünnen Pigmentschicht umgeben, während die Basalenden der Nebenzepigmentzellen und die subretinale Pigmentzone etwas dichtere Pigmentanhäufungen enthalten, die aber wesentlich kleiner sind als diejenigen der Wildrasse. Bei frisch geschlüpften Fliegen weicht das basale Pigment in seinem Farbton deutlich von dem des übrigen Auges ab; es ist heller und im Vergleich zum distalen Pigment mehr orangefarben. Dieser Farbunterschied verschwindet jedoch später wieder, und bei älteren Fliegen ist das Pigment im ganzen Auge einheitlich rot. Die Hauptpigmentzellen der *v*- und *cn*-Tiere sind stets farblos.

Im Dunkelfeld leuchtet das dichte Pigment im distalen Bereich des Auges stark orange-gelb, das spärliche, die Retinulazellen umgebende weniger stark grün, das dichtere Pigment in der basalen und subretinalen Pigmentzone wieder stark orange-gelb. Vereinzelt liegende Pigmentkörner leuchten aber überall grün, gelegentlich auch gelbgrün.

d) *Das Pigment der Mutanten se, sebw und secn.* Die Fliegen der Rasse *sepi*a haben beim Schlüpfen rotbraune Augen, deren Farbe in den folgenden Tagen bis zu einem tiefen Schwarzbraun nachdunkelt. In den Augen frisch geschlüpfter *se*-Fliegen findet man zunächst die ockergelben und weinroten Pigmentkörner, die hier ebenso gelagert sind, wie im wildfarbigen Auge. Anstelle des roten Pigments, also vor allem in den Distalenden der Nebenzepigmentzellen, enthalten die *se*-Augen aber gelbes Pigment (Abb. 3d), das bei älteren Fliegen zu Gelbbraun nachdunkelt.

Im Dunkelfeld leuchten die Pigmentkörner in den Hauptpigmentzellen und an den Distalenden der Nebenzepigmentzellen schwach hellgrün, diejenigen im proximalen Teil der Nebenzepigmentzellen schwach orange, und die in der basalen und subretinalen Pigmentzone hell orangefarben.

Durch die Mutation von *se*⁺ zu *se* wird somit die Braunkomponente nicht beeinflusst. Die doppelt rezessiven Tiere der Rasse *sebw* unterscheiden sich deshalb auch in keiner Weise von *bw*-Fliegen (MAINX 1938). Dagegen wird die Rotkomponente durch *se* sehr stark verändert, wie die Kombinationen *secn* und *sew* zeigen. Da diese beiden Rassen sich morphologisch nicht voneinander unterscheiden, beschreibe ich hier nur die *secn*-Fliegen.

Frisch geschlüpfte *secn*-Fliegen haben rein hellgelbe Augen, deren Farbe später über Gelbbraun und Mittelbraun zu einem tiefen Sepiabraun nachdunkelt. Bei der histologischen Untersuchung zeigt sich, daß die Verteilung der Pigmentkörner genau die gleiche ist wie in *cn*-bzw. *v*-Augen. Das gelbe Pigment bildet dichte Anhäufungen in den Distalenden der Nebenzepigmentzellen, umgibt als dünner Pigmentmantel die Retinulazellen und bildet kleine, dichtere Anhäufungen an der Basis und unterhalb der Basalmembran (Abb. 3e).

Im Dunkelfeld leuchtet das Pigment gelbgrün, bei älteren Fliegen etwas stärker als bei frisch geschlüpfen. Bei dichter Lagerung erscheint es gelb bis orange-gelb, an den Rändern des Auges bei älteren Fliegen sogar orange.

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß zwischen dem gelben *Sepia*-Pigment und dem ockergelben Pigment der Hauptpigmentzellen von *+*- und *bw*-Tieren kein Zusammenhang besteht. Es handelt sich bei diesem Pigment vielmehr um die Rotkomponente, die durch das mutierte Gen *se* qualitativ verändert worden ist.

e) *Das Pigment der Stirnocellen.* Außer den Komplexaugen besitzt *Drosophila* drei einlinsige Stirnocellen (Abb. 4). Sie bestehen jeweils aus einer Cornealinse, einer Schicht von flachen Corneazellen und darunter einer hohen Retinazell-

schicht, die an ihrer Basis Pigment enthält (DEMEREK 1950). In den Stirnocellen kommt ausschließlich das braune Pigment vor: Fliegen der Rassen *v* und *cn* haben daher in jeder Genkombination farblose Stirnocellen.

Das in den Stirnocellen enthaltene Pigment hat allerdings eine andere Farbe als die entsprechende Braunkomponente in den Komplexaugen. Es ist nämlich nicht weinrot, sondern gelbbraun. Dieser Farbunterschied fällt bei solchen Querschnitten durch *bw*-Köpfe besonders auf, in denen Komplexaugen und Stirnocellen gleichzeitig getroffen sind.

Wie später noch besprochen werden soll, entsteht das weinrote Pigment in den Komplexaugen über eine gelbbraune Vorstufe, und zwar ist der Farbumschlag zu weinrot nach BECKER (1942) die Folge eines Reduktionsvorganges. Das Pigment der Stirnocellen wäre danach ein Oxydationsprodukt des in den Komplexaugen vorliegenden Pigments. Behandelt man Totalpräparate von Stirnocellen mit einer Lösung von Natriumdithionit, so schlägt dementsprechend die gelbbraune Farbe des Pigments nach weinrot um.

Daß in den Stirnocellen kein rotes Pigment gebildet werden kann, muß ich besonders betonen, weil NOLTE (1950) behauptet hat, die Granula der *Drosophila*-Augen enthielten stets beide Pigmentkomponenten. Dies trifft für die Granula in den Stirnocellen ebensowenig zu, wie für die ockergelben Pigmentkörner in den Hauptpigmentzellen, deren Existenz NOLTE allerdings bestreitet. Die Fähigkeit, beide Pigmentkomponenten einzulagern, haben nach meinen Befunden nur die Granula in den Nebenzellen. *Drosophila* besitzt danach mindestens zwei verschiedene Sorten von Trägergranula.

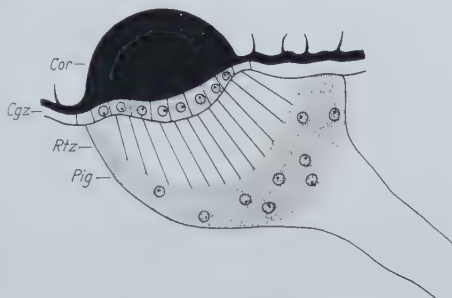


Abb. 4. Schematischer Längsschnitt durch einen Ocellus (nach HERTWECK). Cgz Corneazellen, Cor Cornea, Pig Pigment, Rtz Retinulazellen

4. Die Entwicklung der Pigmente

Die Pigmententwicklung erfolgt in 2 Phasen, und zwar entsteht zuerst die braune Komponente (COCHRANE 1937, DANNEEL 1941). In den Augen der Tiere, die braunes Pigment zu bilden vermögen (*+*, *bw*, *se*), erscheint etwa 50 Std nach der Verpuppung die erste, blaßgelbe Färbung, und zwar zuerst an der Basis der Nebenzellen (Abb. 5). Sie leuchten im Dunkelfeld schwach grün.

Zu Beginn des 3. Puppentages haben die Ommatidienanlagen noch Kugelform; zwischen ihnen liegen die Nebenzellen als kegelförmige Gebilde, deren Spitzen den äußeren Rand des Auges noch nicht erreichen (Abb. 5). Während nun die Ommatidienanlagen sich zu strecken beginnen, verlängern sich auch die Nebenzellen. Dabei wandern ihre vorher in der Nähe der Basalmembran gelegenen Kerne distalwärts und ziehen einen Teil des Plasmas, und damit auch des Pigments, hinter sich her. Die Pigmentierung schreitet also zentrifugal fort. Bei 60 Std alten Puppen hat sie ungefähr die halbe Höhe der Ommatidienanlagen erreicht, die zu dieser Zeit pilzförmig sind (Abb. 6). Die Farbe der Pigmentkörner hat sich inzwischen vertieft; sie sind gelbbraun geworden und leuchten jetzt im Dunkelfeld gelbgrün. Abb. 7 stellt einen Längsschnitt durch das Auge einer 66 Std alten Puppe dar. Die Ommatidienanlagen haben sich inzwischen noch

weiter gestreckt, und die Kerne der Nebenzellen sind in das äußere Drittel des Auges vorgerückt. Gegen Ende des 3. Puppentages hat das Pig-

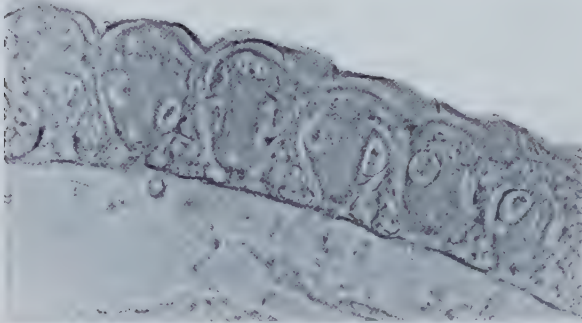


Abb. 5. Längsschnitt durch das Auge einer 55 Std alten +Puppe (ungefärbt). Vergr. 720:1

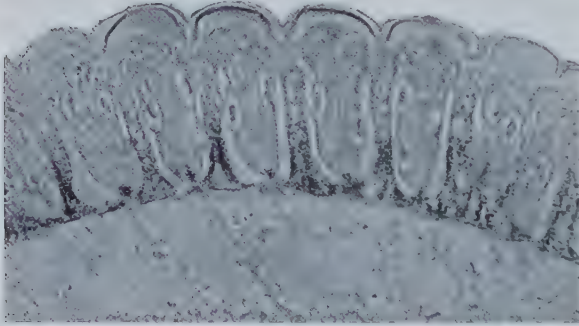


Abb. 6. Längsschnitt durch das Auge einer 60 Std alten +Puppe (ungefärbt). Vergr. 720:1

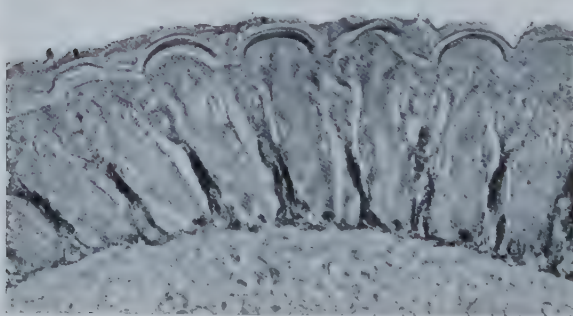


Abb. 7. Längsschnitt durch das Auge einer 66 Std alten +Puppe (ungefärbt). Vergr. 640:1

ment die distalen Enden der Retinulazellen erreicht; seine Farbe läßt sich nun als mittelbraun bezeichnen. Im Dunkelfeld leuchtet es gelbgrün, an einigen Stellen auch orange-gelb.

Während der drei ersten Puppentage sind also nur die Nebenzellen pigmentiert. Erst zu Beginn des 4. Tages erscheint zunächst noch blaßgelbes Pigment in den Hauptpigmentzellen. Außerdem setzt jetzt auch die Bildung des roten Pigments ein, die sich jedoch besser an den Puppen der beiden rot-äugigen Rassen *v* und *cn* verfolgen läßt (s. unten).

Ungefähr um die Mitte des 4. Puppentages erscheinen bei der Wildrasse zwischen den braunen Pigmentkörnern im proximalen Teil der Nebenzellen tief weinrote, die sich schnell vermehren, während die Anzahl der braunen Pigmentkörner abnimmt. In den Augen frisch geschlüpfter Fliegen ist dann fast nur noch weinrotes Pigment vorhanden. Die ursprünglich braunen Pigmentkörner machen also einen Farbwechsel durch, eine Er-

scheinung, die bereits von COCHRANE (1937) bei *Drosophila pseudo-obscura* festgestellt wurde. Sie hat nichts mit der Ablagerung der roten Pigmentkomponente zu tun, denn sie findet auch bei *bw*-Puppen statt und besteht, wie gesagt, wahrscheinlich in einem Reduktionsvorgang. In der subretinalen Pigmentzone treten erst kurz vor dem Schlüpfen der Fliege die ersten Pigmentkörner auf. Da sie

von Anfang an weinrot sind, sich also nicht allmählich ausfärben, ist nicht anzunehmen, daß sie an dieser Stelle entstehen; es handelt sich vielmehr um eine Ausbreitung des basalen Pigments der Nebenzellen, das ja dieselbe Farbe hat. Bei frisch geschlüpften Fliegen ist die Ausfärbung der braunen Pigmentkomponente im wesentlichen beendet.

Die Bildung des roten Pigments setzt erst zu Beginn des 4. Tages nach der Verpuppung ein. Die Farbe der Augen bei *v*- und *cn*-Puppen ist zu diesem Zeitpunkt ein helles Orange. Im Schnitt sieht man die ersten, blaß orange gefärbten Pigmentkörner in den verdickten Distalenden der Nebenzellen, die auch die Kerne enthalten. Im Dunkelfeld leuchten diese Pigmentkörner schwach grün. Bald danach vertieft sich aber die Farbe sehr schnell und ist jetzt mehr orangerot. Auch diejenigen Granula, die entlang den Retinazellen und an der Basis liegen, haben inzwischen begonnen, sich auszufärben, und leuchten im Dunkelfeld hellgrün. Bis zum Schlüpfen der Fliege wird die Farbe noch intensiver, und zwar erscheint das dichte distale Pigment nun tiefrot, das spärliche entlang den Ommatidien hellrot, das basale dagegen mehr orangerot. Das basale Pigment bleibt also hinter dem distalen in der Entwicklung zurück, wie überhaupt die Ablagerung des roten Pigments im Gegensatz zu der des braunen nicht zentrifugal, sondern zentripetal verläuft. Offenbar werden bei den rotäugigen Tieren zunächst diejenigen Granula ausgefärbt, auf denen auch im wildfarbigen Auge das rote Pigment entsteht, während sich die früher gebildeten, basalen Granula erst später pigmentieren. Bei älteren *v*- und *cn*-Fliegen ist das Pigment im ganzen Auge einheitlich rot.

Bei der Rasse *se* verläuft die Entstehung des braunen Pigments wie bei den *+* und *bw*-Tieren. Dagegen setzt die Bildung des gelben Sepiapigments später ein als die des roten, wie Vergleiche zwischen gleichaltrigen Puppen der Rassen *cn* und *se**cn* zeigen. Wenn nämlich die Augen von *cn*-Puppen schon die erste, ganz schwache Orangefärbung zeigen, sind die Augen von *se**cn*-Puppen noch völlig farblos. Die Ausfärbung beginnt hier vielmehr erst um die Mitte des 4. Puppentages und schreitet nach dem Schlüpfen noch längere Zeit fort, wobei die Augen, wie gesagt, von Hellgelb zu Schwarzbraun nachdunkeln. Das mutierte Gen *se* bewirkt also nicht nur eine qualitative Veränderung des roten Pigments, sondern auch eine Verzögerung seiner Bildung.

Das gelbbraune Pigment in den Stirnocellen der *+*, *bw*- und *se*-Fliegen erscheint erst im Verlauf des 4. Puppentages, also viel später als in den Nebenzellen, und färbt sich, wie erwähnt, auch nicht zu Weinrot um. Es sieht danach so aus, als wäre das Pigment der Stirnocellen eine verspätet entstandene, unverändert gebliebene Vorstufe des weinroten Pigments.

5. Die Rasse „white“

Wie ich bereits eingangs erwähnte, liegt der Gedanke nahe, das Gen *w* von *Drosophila* bewirke ebenso wie das Gen *wa* von *Ephesia* einen Ausfall der für die Pigmentsynthese notwendigen Trägergranula. Das Gen *w* ist jedoch im Gegensatz zu *wa* das Endglied einer Serie von Allelen, bei denen die Augenfarbe vom Rotbraun der Wildrasse über mehrere Zwischenstufen zum Weiß der Mutante *w* abfällt. Wenn nun das Gen *w* von *Drosophila* wirklich dem Gen *wa* von *Ephesia* homolog wäre, so müßte die zunehmende Verdünnung der Augenfarbe bei den

verschiedenen Mutanten der *w*-Reihe, wie etwa *w^a* und *w^e*, durch eine zahlenmäßige Abnahme der Pigmentkörner zustandekommen, nicht aber durch eine Aufhellung der Farbe der einzelnen Granula.

Die histologische Untersuchung der *w^a*-Augen ergab jedoch, daß die Granula in den Hauptpigmentzellen zwar viel heller waren als bei der Wildrasse, daß ihre

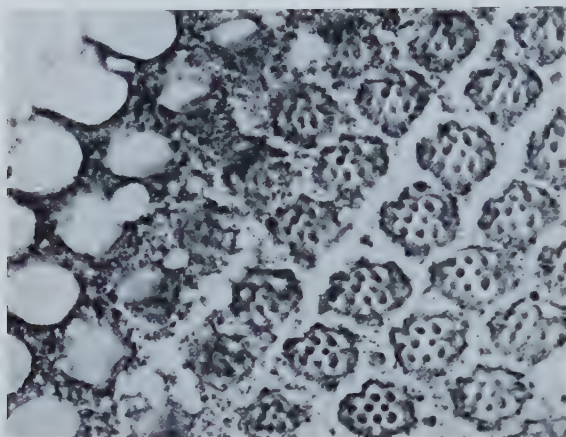


Abb. 8. Querschnitt durch ein *white*-Auge (Osmiumsäure, ungefärbt). Vergr. 720:1

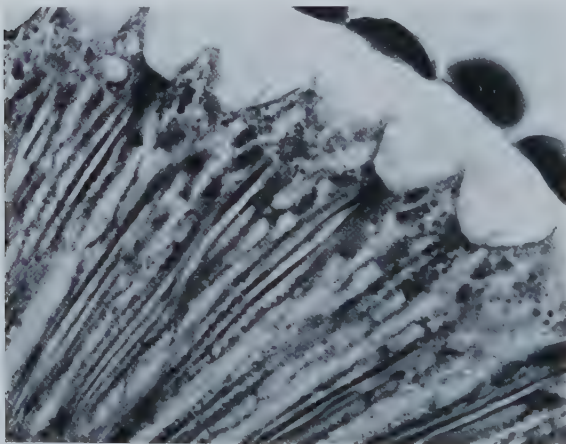


Abb. 9. Längsschnitt durch ein *white*-Auge (absoluter Alkohol-Hämatoxylin-Heidenhain). Vergr. 680:1

Aus diesen Beobachtungen geht klar hervor, daß die Verdünnung der Augenfarbe bei den Allelen der *white*-Serie nicht auf einer zahlenmäßigen Abnahme der Trägergranula beruht, sondern auf einer Verminderung der auf ihnen entstehenden Pigmentmenge, und zwar wird das rote Pigment beim Übergang von *w⁺* zu *w^a* oder *w^e* stärker reduziert als das braune.

Bei der Untersuchung der weißäugigen *w*-Fliegen stellte sich zunächst heraus, daß die Darstellung der unpigmentierten Trägergranula technisch sehr schwierig ist, und zwar nicht nur bei den *w*-Tieren, sondern auch bei den Mutanten *vbw* und *cnbw*, wo ja nachweislich Trägergranula vorhanden sind, die sich unter dem Ein-

Anzahl aber nicht auffallend vermindert war. Die Basalenden der Nebenzellen enthalten Pigmentkörner, deren Farbe zwischen blaßrosa und einem ganz schwachen Bräunlichgelb schwankt, während die nur im Phasenkontrastmikroskop sichtbaren Granula in den Distalenden der Nebenzellen farblos sind. Die Mutation von *w⁺* zu *w^a* beeinflußt also in erster Linie die Rotkomponente.

In Schnitten durch *w^e*-Augen erscheint die Farbe der Pigmentkörner etwas dunkler als bei *w^a*, nämlich in den Hauptpigmentzellen hellgelb, in der basalen und subretinalen Pigmentzone hellweinrot. Die Distalenden der Nebenzellen sind auch bei *w^e*-Tieren im allgemeinen farblos, manchmal aber auch ganz schwach rosa. Die Retinulazellen sind von farblosen bzw. ganz blaß gefärbten Granula umgeben. Die Rotkomponente fehlt also auch bei *w^e* Augen fast ganz.

fluß von Kynurenin bzw. Oxykynurenin auch auszufärben vermögen (DANNEEL 1941).

Die farblosen Granula lassen sich bei keiner der 3 Mutanten nach Carnoy-Fixierung mit Sicherheit von dem ebenfalls granulär fixierten Plasma unterscheiden. Etwas besser gelingt die Darstellung der Trägergranula bei Fixierung mit absolutem Alkohol und Stückfärbung mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN. Hier sieht man in den Schnitten durch *w*-Augen vor allem an den distalen Enden der Nebenzellen zahlreiche, blaßblau gefärbte Granula, die in Querschnitten (Abb. 9) noch etwas deutlicher zu erkennen sind. Auf die gleiche Weise behandelte *cnbw*-Augen sehen genau so aus.

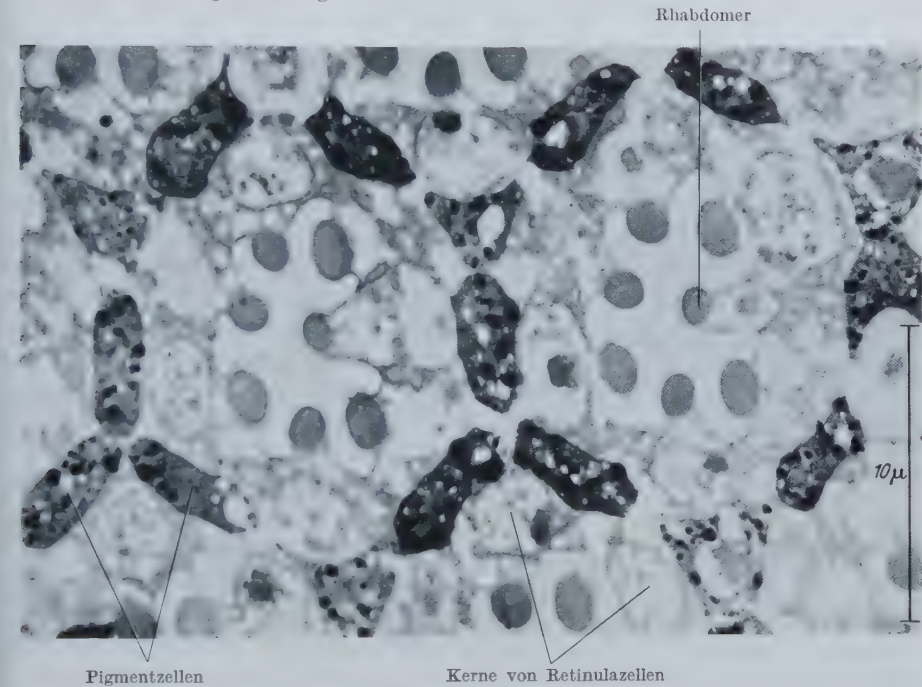


Abb. 10. Querschnitt durch zwei Ommatidien mit den dazwischenliegenden Nebenzellen. (Elektronenoptische Aufnahme)

Die besten Ergebnisse erhält man bei Fixierung mit Osmiumsäure und Stückfärbung mit Hämatoxylin nach SCHULTZE. In so behandelten Schnitten durch *w*-Augen sind die Granula deutlich als blaßgefärbte, stark lichtbrechende Körner zu erkennen. In Längsschnitten sieht man sie wieder am besten in den Distalenden der Nebenzellen, wo sie besonders zahlreich sind. Relativ gute Ergebnisse liefern auch ungefärbte, mit Osmiumsäure fixierte Präparate, wie Abb. 8 zeigt.

Die Unterdrückung der Pigmentbildung durch das mutierte Gen *w* beruht somit nicht auf einem Ausfall der Trägergranula, sondern auf der Blockierung eines noch unbekannten, zur Ausfärbung notwendigen, chemischen Prozesses.

6. Elektronenoptische Untersuchungen

Für die elektronenoptische Untersuchung der Pigmentzellen wurden zunächst Tiere mit verhältnismäßig schwach pigmentierten Augen, nämlich junge *sev*-Fliegen, ausgewählt.

Abb. 10 gibt eine solche elektronenoptische Aufnahme von einem ultradünnen Querschnitt durch ein Ommatidium wieder. Der Schnitt liegt im Bereich der Retinulakerne, von denen jedoch nur zwei getroffen sind. Sehr deutlich sieht man aber die Nebenzellen, deren Gestalt und Struktur man im Lichtmikroskop überhaupt nicht erkennen kann. Diese Zellen erscheinen im Querschnitt als längliche Gebilde, wenn man von denjenigen absieht, die zwischen drei aneinanderstoßenden Ommatidien liegen und mehr oder weniger dreieckig sind. Auf den Feinbau der Retinula brauche ich hier nicht näher einzugehen, weil darüber erst kürzlich berichtet wurde (DANNEEL und ZEUTZSCHEL 1957).

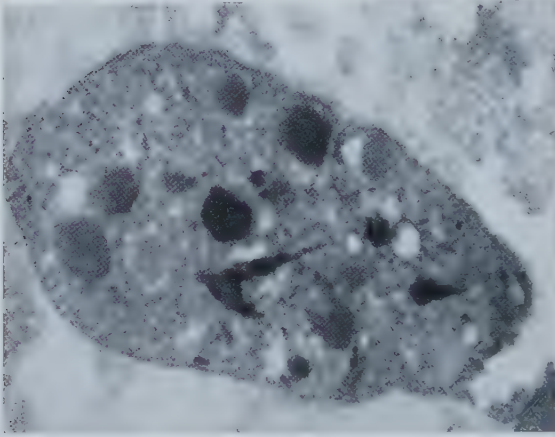


Abb. 11. Nebenzelle bei stärkerer Vergrößerung

Abb. 11 ist eine stärker vergrößerte Aufnahme eines ultradünnen Querschnittes durch eine Nebenzelle einer *sev*-Fliege. Außer den dunklen Pigmentkörnern und helleren Gebilden unbekannter Natur erkennt man im Plasma der Zelle einige „Vakuolen“, die aber möglicherweise durch das Herausfallen von Pigmentkörnern entstanden sind.

Die Pigmentkörner selbst liegen als dunkle, rundovale Gebilde im Plasma der Pigmentzellen. Ihr Durchmesser

beträgt im Durchschnitt $0,4-0,5\mu$. Da auch bei starker Vergrößerung im Innern der Pigmentkörner keinerlei Struktur zu erkennen ist, muß man wohl annehmen, daß der Farbstoff die Pigmentkörner völlig durchsetzt und ihnen nicht nur aufgelagert ist.

In *cnbw*- und *w*-Augen fand ich bisher elektronenoptisch keine Strukturen, die den Pigmentkörnern der gefärbten Augen in Lage und Form entsprächen, doch dürfte dieses negative Ergebnis, das ja den lichtoptischen Befunden widerspricht eine Folge der offenbar ungeeigneten Präparationstechnik sein. Diese Versuche müssen also später mit besseren Methoden wieder aufgenommen werden.

Zusammenfassung

1. Das Augenpigment der wildfarbigen *Drosophila* besteht aus 2 Komponenten, einer roten und einer braunen. Während aber die rote Farbe nur durch eine einzige Sorte von hellroten Pigmentkörnern bewirkt wird, liegen der braunen Farbe ockergelbe und weinrote Pigmentkörner zugrunde. Das weinrote Pigment zeigt im Gegensatz zum ockergelben das typische Redoxverhalten der Ommochrome, läßt sich also zu einer gelbbraunen Stufe oxydieren.

2. Im wildfarbigen Auge enthalten die Hauptpigmentzellen nur ockergelbes Pigment. In den Nebenzellen liegen distal hellrote, proximal weinrote Pigmentkörner (Abb. 3a).

3. *bw*-Augen enthalten infolge des Ausfalls der Rotkomponente nur ockergelbe und weinrote Pigmentkörner. Die Distalenden der Nebenzellen sind daher nur schwach pigmentiert (Abb. 3b).

4. In *v*- und *cn*-Augen sind nur hellrote Pigmentkörner vorhanden, die in den distalen und proximalen Enden der Nebenzellen dichte Anhäufungen bilden. Die Hauptzellen enthalten kein Pigment (Abb. 3c).

5. Unter dem Einfluß des Gens *se* wird an Stelle des roten Pigments ein gelbes gebildet. Seine Ablagerung beginnt aber später als die des roten und dauert nach dem Schlüpfen noch mehrere Tage an, wobei das Auge stark nachdunkelt (Abb. 3d, e).

6. In den Stäbchenzellen kommt nur ein gelbbraunes Pigment vor. Da seine Farbe unter dem Einfluß von Reduktionsmitteln nach weinrot umschlägt, handelt es sich wahrscheinlich um die oxydierte Stufe des weinroten Pigments der Nebenzellen der Komplexaugen. Die Ocellen der rotäugigen Rassen *v* und *cn* sind farblos.

7. Die Ausfärbung des Auges setzt bei den wildfarbigen Puppen zu Beginn des 3. Puppentages ein. Zuerst wird das braune Pigment gebildet, und zwar an der Basis der Nebenzellen. Die Körner sind zunächst gelb, ihre Farbe dunkelt dann nach zu Braun und schlägt schließlich in Weinrot um. In den Hauptzellen erscheint das erste Pigment einen Tag später als in den Nebenzellen. Gleichzeitig tritt in den Distalenden der Nebenzellen das erste rote Pigment auf. Die Pigmentierung der Stäbchenzellen beginnt zuletzt, nämlich um die Mitte des 4. Puppentages.

8. Das Gen *w* ist das Endglied einer Serie von Allelen mit stufenweiser Verdünnung der Augenfarbe, die durch Verringerung des auf den Trägergranula abgelegten Pigments zustande kommt. Das Allel *w* selbst unterdrückt nicht die Bildung der Trägergranula, sondern verhindert auf noch unbekannte Weise deren Ausfärbung. Mit verschiedenen Fixierungs- und Färbemethoden lassen sich nämlich auch in den Augen von *w*-Fliegen Granula nachweisen.

9. Auf elektronenoptischen Aufnahmen ultradünner Querschnitte durch *sev*-Augen sieht man die Pigmentkörner als dunkle, runde bis ovale Gebilde von etwa $0,4\text{--}0,5\ \mu$ Durchmesser in dem dichten Plasma der Nebenzellen. Die Pigmentkörner sind völlig vom Farbstoff durchsetzt und lassen keine Struktur erkennen.

10. Elektronenoptische Aufnahmen von Dünnschnitten durch *cnbw*- und *w*-Augen ließen bisher keine Gebilde erkennen, die in ihrer Form und Lagerung völlig den Pigmentkörnern der gefärbten Augen entsprächen, doch dürfte dies eine Folge der Präparationstechnik sein.

Literatur

BECKER, E.: Über Eigenschaften, Verbreitung und die genetisch-entwicklungsphysiologische Bedeutung der Pigmente der Ommatin-Ommine-Gruppe (Ommochrome) bei den Arthropoden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 157 (1942). — BUTENANDT, A., U. SCHIEDT, E. BIEKERT u. R. CROMARTIE: Über Ommochrome, IV. Mitteilung: Konstitution des Xanthommatins. Justus Liebigs Ann. Chem. **890**, 75 (1954). — BUTENANDT, A., W. WEIDEL u. H. SCHLOSSBERGER: 3-Oxykynurenin als *cn*⁺-Gen-abhängiges Glied im intermediären Tryptophanstoffwechsel. Z. Naturforsch. **4b**, 242 (1949). — COCHRANE, F.: An histological analysis of eye pigment development in *Drosophila pseudo-obscura*. Proc. roy. Soc. Edinb.

57, 385 (1937). — DANNEEL, R.: Die Ausfärbung überlebender *v*- und *cn*-*Drosophila*augen mit Produkten des Tryptophanstoffwechsels. Biol. Zbl. **61**, 388 (1941). — DANNEEL, R., u. B. ESCHRICHT: Untersuchungen über den gelben Augenfarbstoff der Mutante „*sepia*“ von *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **11b**, 105 (1956). — DANNEEL, R., u. B. ZEUTZSCHEL: Über den Feinbau der Retinula bei *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **12b**, 580 (1957). — DEMEREC, M.: Biology of *Drosophila melanogaster*. New York 1950. — DIETRICH, W.: Die Facettenaugen der Dipteren. Z. wiss. Zool. **92**, 465 (1909). — EPHRUSSI, B., et S. CHEVAIS: Développement des couleurs des yeux chez la *Drosophile*: Relation entre production, utilisation et libération des substances diffusibles. Bull. biol. France Belg. **72**, 48 (1938). — HANSER, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranula bei verschiedenen Rassen von *Ephesia kühniella* Z. und *Ptychopoda seriata* Schrk. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 74 (1948). — HERTWECK, R.: Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster*. Z. wiss. Zool. **139**, 559 (1931). — JOHANNSEN, O. A.: Eye structure in normal and eye-mutant *Drosophilas*. J. Morph. **39** (1924). — KÜHN, A.: Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwissenschaftler **43**, 25 (1956). — MAINX, F.: Analyse der Genwirkungen durch Faktorenkombination. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 256 (1938). — NOLTE, D. J.: The eye pigment system of *Drosophila* I: The pigment cells. J. Genet. **50**, 79 (1950). — PALADE, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. **95**, 285 (1952). — RHODIN, J.: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Diss. Stockholm 1954. —

BRIGITTE ZEUTZSCHEL,
Institut für Bienenkunde, Gutshaus Melb, Melbweg

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

DIE ANALYSE VON GENMUTANTEN
MIT GEÄNDERTEN FORTPFLANZUNGSEIGENSCHAFTEN
BEI *ALLOMYCES ARBUSCULA* BUTL.

Von

CLAUDIUS STUMM

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1958)

I. Einleitung

Der Phycomycet *Allomyces arbuscula* (*Blastocladales*) ist in morphologischer und physiologischer Hinsicht vielfach untersucht worden [BARETT (1912), BUTLER (1911), COKER (1930), EMERSON (1938, 1941, 1950, 1955), EMERSON und FOX (1940), EMERSON und WILSON (1949, 1954), HATCH (1933, 1935, 1938, 1944), HATCH und JONES (1944), INGRAHAM und EMERSON (1954), KNIEP (1929, 1930), MACHLIS (1953a, b, c), MACHLIS und OSSIA (1953a, b), QUANTZ (1943), SÖRGEL (1936, 1937), SOST (1955), TETER (1944), TURIAN (1954, 1957), WHIFFEN (1951), WILSON (1952)]. Der normale Entwicklungszyklus vollzieht sich in einem antithetischen Generationswechsel zwischen Sporophyten und Gametophyten, die isomorph sind:

Die zweigeißelige Zygote wächst zu einem diploiden vegetativen Mycel aus, dem Sporophyten (nSp, Abb. 5 rechts). Er bildet zwei Typen von Sporenbehältern: In den Zoo- oder Mitosporangien entstehen durch Mitosen einkernige, diploide Planosporen, die wieder zu einem nSp auswachsen. In den Dauer- oder Meiosporangien läuft die Meiose ab und, damit einhergehend, ein streng gerichteter Determinationsvorgang. Es entstehen einkernige, haploide Planosporen, aus denen der Gametophyt (nG, Abb. 1) hervorgeht, dessen Hyphen in paarweiser Anordnung Mikro- und Makrogametangien tragen. Aus den Gametangien gehen begeißelte Anisogameten (die Mikrogameten sind relativ kleiner und durch γ -Karotin rötlich gefärbt) hervor, die durch Plasma- und Karyogamie die diploide Zygote bilden. Damit ist der Ring des antithetischen Generationswechsels geschlossen.

SOST (1955) erzeugte durch Colchicinierung bei *Allomyces* diploide Gametophyten und tetraploide Sporophyten. Er bewies damit, daß der Generationswechsel nicht obligatorisch mit dem Kernphasenwechsel gekoppelt ist. Weitere



Abb. 1. Normaler Gametophyt (nG) mit den paarweise übereinanderstehenden Gametangien. Mikrogametangien stets basal (hypogyne Stellung). Vergr. 200:1

genetische Untersuchungen wurden an diesem Objekt bisher von EMERSON und WILSON (1954) durchgeführt. Sie kreuzten *Allomyces arbuscula* mit *A. javanicus* var. *macrogynus* EMERS. Da die beiden Arten jedoch verschiedene Chromosomenzahlen ($n = 8$ und $n = 14$) haben, kam es — vermutlich durch Meiosestörungen — zu nicht eindeutig analysierbaren Aufspaltungen, bei denen neben den beiden Elterntypen auch intermediäre Formen auftraten.

Die grundlegende Entdeckung KNEIPS (1930), daß *Allomyces* zwei gleichgestaltete Generationen besitzt, hatte eine starke Beachtung der Entwicklungszyklen bei den Blastocladialen zur Folge. So wurden während der folgenden Jahre bei neuen Arten sowohl genotypische als auch phänotypische Geschlechtsbestimmung gefunden. Jedoch ist auch heute noch nichts über die genetische Grundlage der bei *Allomyces* klar ausgeprägten phänotypischen Geschlechtsbestimmung bekannt. Ebenso weiß man nichts über die Vererbung einer zuerst von SÖRGEL (1937) beschriebenen abweichenden Eigenschaft, daß Gametophyten neben den Gametangien auch Dauersporangien tragen können. Es war wünschenswert, mit Hilfe von Röntgenmutanten Aufschlüsse über das genetische Verhalten dieser Phänome zu gewinnen.

II. Material und Methoden

1. Material

Der in allen Experimenten verwendete Stamm von *Allomyces arbuscula* BUTL. stammt aus dem „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ in Baarn, Niederlande. Je ein aus Einsporkulturen gezogenes Sporophyten- und Gametophytenmycel wurde während der Dauer der Arbeit vegetativ vermehrt; es behielt seine Wüchsigkeit unverändert bei. (SOST 1955; dagegen RIZET 1953a, b bei *Podospora anserina*.)

2. Nährmedien und Kulturmethoden

Zwei Arten von Agarsubstraten wurden benutzt, die dem jeweiligen Verwendungszweck angepaßt waren:

a) *YpSs-Agar* nach EMERSON (EMERSON 1941). Mit diesem Medium gefüllte Schrägröhrchen dienten zur Erhaltung der Stammkulturen und Mutanten sowie zur Massenanzucht von Dauersporangien für die genetischen und cytologischen Experimente.

b) *Lävulose-Pepton-Agar* (verändert nach SOST 1955): Auf 1 Liter dest. Wasser 2,5 g Lävulose, 2,5 g Pepton (Merck) und 15 g Agar.

Dieses Substrat diente zum Plattieren von bestrahlten und unbestrahlten Sporen. Das Mycel wächst darin rasch und nicht zu dicht; die Hyphen sind nicht allzusehr mit Granula angefüllt, was bei niedrigerer Pepton- und höherer Zuckerkonzentration gelegentlich vorkommt und dann die cytologische Untersuchung, besonders Kernmessungen, sehr erschwert. Sowohl Gametophyt als auch Sporophyt lassen sich in diesem Medium unter den üblichen Vorsichtsmaßnahmen sehr gut rein kultivieren.

Die Erhaltungskulturen in Schrägröhrchen wurden bei 20° C, alle übrigen Mycelien dagegen bei 34° C kultiviert. Bei längerer Aufbewahrung bei 10° C erschien der Pilz stark geschädigt und starb schließlich ab.

3. Technik der Kernmessung

Zur Bestimmung des Ploidiegrades bei *Allomyces* wählten SÖRGEL (1937) und SOST (1955) die Planimetrierung der gezeichneten Kernumrisse. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die Durchmesser lebender Kerne bei Phasenkontrastbeleuchtung (Leitz) mit Hilfe des Schraubenmikrometers „Oknor“ von Leitz bestimmt. (Über die Genauigkeit verschiedener Meßmethoden s. AMBROSIO 1953). Die Meßwerte wurden nach dem *t*-Test nach STUDENT abgesichert (WEBER 1956).

Da bereits SOST (1955) für den vorliegenden Stamm durch cytologische Untersuchungen die Genomzahlen für die unterschiedlichen Kerngrößen festgestellt hatte, konnte auf eine erneute Chromosomenzählung verzichtet werden.

4. Technik der Kernfärbung

Während sich die Kerne in den Hyphen ohne Schwierigkeit mit üblichen Methoden darstellen ließen, blieben sie in den Dauersporangien ungefärbt. Mit Orcein-Essigsäure nach LA COUR (1941; Orcein von G. T. Gurr, London) gelang die Färbung erst nach einer Modifikation der Vorschrift von WILSON (1952). Die Dauersporangien wurden auf dem Objektträger mit der 1%igen Farbstofflösung überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und leicht erwärmt. Das Präparat gelangte darauf für 24 Std in eine Petrischale, deren Boden mit 45%iger Essigsäure befeuchtet war. Nach dieser Zeit wurde zur Differenzierung vorsichtig frische 45%ige Essigsäure unter das Deckglas geleitet und dann gequetscht.

5. Technik der Kreuzungen

Nach verschiedenen Versuchen bewährte sich folgende Technik (verändert nach EMERSON und WILSON 1954): Von 5 Tage auf YpSs-Agar kultiviertem Mycel wurde Material abgenommen und in einem großen Tropfen Wasser auf dem Objektträger suspendiert. Durch rasches Hin- und Herschieben des Tragglasses auf einer glatten Unterlage reicherten sich die Gametangien in der Mitte des Tropfens an und konnten, getrennt von mitgeschleppten Hyphen und kleinen Agarstücken, abpipettiert und zusammen mit 2 cm³ Aqua dest. auf eine frische YpSs-Platte übertragen werden. Auf eine zweite YpSs-Platte waren schon vorher einzelne Wassertropfen aufgesetzt worden. Mit Hilfe von Kapillarpipetten, deren Öffnungen gerade dem Durchmesser der Gametangien entsprachen, wurden von der ersten Platte, die die Aufschwemmung enthielt, bei mittlerer Vergrößerung einzelne Makrogametangien aufgenommen und zu je zweien in die Wassertropfen der zweiten Schale übertragen. Der Prozeß des Abnehmens, Aufschwemmens, Suchens und Übertragens wiederholte sich dann für die Mikrogametangien des Kreuzungspartners. Es gelangten nie mehr als 4 Gametangien — zwei von jedem Partner — zusammen in einen Wassertropfen. Bei normalem Verlauf kopulierten die ausgekeimten Gameten miteinander, und nach 24 Std konnten die jungen Sporophyten abgenommen und auf Schrägröhrchen geimpft werden. Aus diesen wurden nach 4 Wochen die reifen Dauersporangien entnommen.

6. Technik der Bestrahlung

Vier Wochen alte Dauersporangien wurden vom Medium abgenommen und in Wasser aufgeschwemmt. Nach 2 1/2 Std hatten sich die meisten Sporangien entleert. Die Suspension von schwärmenden Sporen wurde bestrahlt. Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die Halbwert-Dosis für Haplo- und Diplosporen bei 5000 r lag. Es wurden zur Mutationsauslösung Dosen angewandt, die zwischen 5×10^3 und 2×10^5 r lagen; Röntgen-Bestrahlungsgerät: Müller „Makro 100“; 100 kV, Al-gefiltert.

Nach der Bestrahlung gelangten die Sporen auf Lävulose-Pepton-Platten, die im Anschluß an eine Bebrütungszeit von 4 Tagen (34⁰) unter dem Stereomikroskop nach morphologisch abweichenden Mycelien durchmustert wurden.

III. Auslösung von Mutationen und Charakterisierung der Mutanten von *Allomyces arbuscula* Butl.

Im Verlaufe der Experimente fanden sich vier strahleninduzierte Mutanten. Ferner entstand aus dem normalen Gametophyten mehrfach spontan ein Myceltyp, der Dauersporangien trug (Mischmycel).

1. Die Röntgenmutante M 70

Das Mycel wurde nach Bestrahlung mit 7×10^4 r erhalten. Es war gegenüber einem normalen Gametophyten langsamwüchsig (Tabelle 1), die Hyphenspitzen erschienen dicht granuliert und im durchfallenden Licht grau gegenüber

den fast hyalinen basalen Hyphenteilen. Auch waren sie häufig spiralig gedreht. Abb. 2 zeigt die Verhältnisse.

Das auffälligste Merkmal ist die Anordnung der Gametangien; diese sitzen meist getrennt an den Hyphen, wobei die Mikrogametangien an Zahl überwiegen. Während die Makrogametangien normale Form besitzen, sind die Mikrogametangien verändert: Sie erreichen fast die Größe der Makrogametangien, sind aber an ihrer roten Karotinoidfärbung leicht von diesen zu unterscheiden.

Kreuzungsversuche: Beide Gametangientypen entließen nur in geringem Maße Gameten (weniger als 0,1%). In 5 Fällen gelang jedoch eine Selbstung;

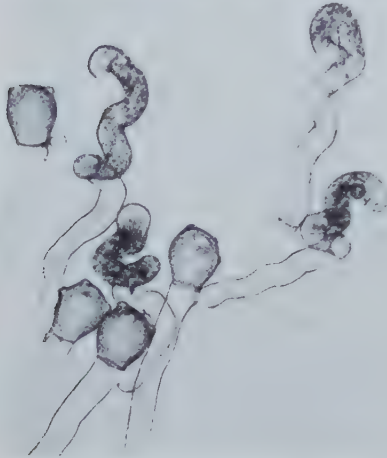


Abb. 2. *M 70*. Gametophyt mit spiralig gedrehten Hyphenspitzen und einzeln stehenden Gametangien. Vergr. 200:1

von den Sporophyten gingen zwei nach wenigen Tagen ein (starke Hemmung und schließlich Sistierung des Wachstums), von den drei verbliebenen Sporophyten waren zwei fertil, ihre Nachkommenschaft bestand zu 100% aus *M 70*-Gametophyten (Anzahl = 123). Der letzte Sporophyt war völlig steril, bildete nur wenige Zoosporangien und ausschließlich Dauersporangien mit grobscholligem, bald zerfallendem Plasma aus. Die Hyphen des sehr schwachwüchsigen Mycels zeigten auffallende Schlängelung. Bei Untersuchung der Kerne ergab sich, daß diese die gleiche Größe hatten wie die Kerne eines normalen Gametophyten. Das Mycel stellte also einen *haploiden Sporophyten* dar. Seine Entstehung kann man sich viel-

leicht so vorstellen, daß bei der Gametenkopulation zwar eine Plasmogamie, nicht aber eine Karyogamie stattgefunden hatte. Durch diese Beobachtung werden die Experimente Sosts (1955) erweitert.

Der haploide Sporophyt blieb über 5 Passagen hinweg haploid, dann änderte sich jedoch die Ploidiestufe, und von der 8. Passage an wurden nur noch diploide Kerne gefunden. Auch danach blieb der Sporophyt noch steril.

2. Die Röntgenmutante *M 183 f*

Nach Bestrahlung mit 6×10^4 r trat unter phänotypisch normalen Mycelien ein Gametophyt auf, der wie die Form *M 70* stark vermännlicht erschien, sich von dieser jedoch charakteristisch unterschied. Die Mikrogametangien waren, wenn sie einzeln saßen, nur wenig größer als normal, fielen aber durch ihre stärker hervortretenden Ausläßpapillen auf. Die Wachstumsgeschwindigkeit war normal (Tabelle 1), jedoch wuchsen die Hyphen sehr oft winkelig oder bogig gekrümmt, im Gegensatz zur streng radiären Wachstumsrichtung des normalen Gametophyten. Wie bei *M 70* zeigten die Gametangien starke Hemmung der Gametenbildung. Eine Rückkreuzung mit nG gelang nicht, wohl aber in 3 Fällen eine Selbstung. Die Sporophyten zeigen das Merkmal des Bogenwachstums besonders deutlich (Abb. 3). Die zu 0,5% fertilen Dauersporangien ergaben ausschließlich *M 183 f*-Gametophyten.

3. Die Röntgenmutante *BM 8*

Als Ausgangsmaterial für eine Bestrahlungsserie wurden Dauersporangien eines „Mischmycels“ (SÖRGEL 1937) herangezogen, dessen morphologisches und

genetisches Verhalten später zu besprechen sind. Die Dauersporangien entließen Sporen, die mit 3×10^4 r bestrahlt wurden. Sie wuchsen nach Plattierung zu Gametophyten aus. Unter diesen fiel ein Mycel (im folgenden BM 8 genannt) auf, dessen Hyphen nicht die in charakteristischer Weise übereinandersitzenden Makro- und Mikrogametangien trugen, sondern neben vereinzelt Dauersporangien ausschließlich rosafarbene, kugelige Organe mit dünner Wandung und Auslaßpapillen (Abb. 4). Diese Organe, die einzeln oder in kurzen Ketten auftraten, hatten einen im Mittel um 10% größeren Durchmesser als ein Makrogametangium. Das Mycel behielt während der ganzen Dauer der Experimente über 2 Jahre hinweg (61 Passagen) seine charakteristische Gestalt bei. Trotz



Abb. 3. *M 183f.* Selbstungssporophyt mit Bogenwachstum; rechts Dauer-, links Zoosporangium. Vergr. 300:1

wiederholten genauen Absuchens unter dem Stereomikroskop wurden nie Körper gefunden, die Makrogametangien glichen. Helle Verdickungen erwiesen sich stets als Organe, die noch nicht ausgefärbt waren und noch keine Schwärmer entlassen konnten. Die Wüchsigkeit war etwas geringer als normal (Tabelle 1).

Tabelle 1. Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Mutanten im Vergleich mit nG und nSp. Angegeben ist der mittlere Myceldurchmesser von jeweils 5 gemessenen Mycelien nach 4 Tagen

	Mycel-Typ								
	nG	nSp	M70	M 183f	BM 8	BM 8 o. D.	MX	Sp 200	MX 200
Mycel-Durchmesser in mm	39	39	9	39	29	49	35	35	35

Zur Prüfung der Annahme, daß bei diesem Gametophyten das weibliche Geschlecht ausgefallen war, wurde ein Agarblöckchen mit Mycel auf eine sterile Lävulose-Pepton-Platte gesetzt, mit 2 cm³ Aqua dest. übergossen und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Als Kontrolle diente nG-Mycel. Nach Ablauf von 2 Std schlüpfen eingeißelige Schwärmer von 6 μ Durchmesser aus, bei der Kontrolle Gameten, die in bekannter Weise (KNIEP 1929) kopulierten und sich dann festsetzten. Während nach 6 Std in der Kontrolle Zygoten auszuwachsen begannen, schwammen die BM 8-Schwärmer immer noch lebhaft umher. Nach 24 Std wies die Kontrollplatte zahlreiche junge Sporophytenmycelien auf. Die Versuchsschale war noch unbewachsen, und es zeigte sich, daß das Testblöckchen von einem Kranz abgestorbener Schwärmer umgeben war. Auch bei weiterer Bebrütung änderte sich nichts

mehr. Schließlich begann das BM 8-Mycel aus dem Agarblöckchen auszuwachsen und sich im Medium der Schale auszubreiten, gleichzeitig ein Beweis dafür, daß nicht etwa das Versuchsmaterial irgendwie geschädigt war. — Dieser Versuch wurde sechsmal mit verschieden großen Agarstücken wiederholt, stets mit dem gleichen Ergebnis. Die BM 8-Schwärmer waren offensichtlich nicht imstande, miteinander Zygoten zu bilden.

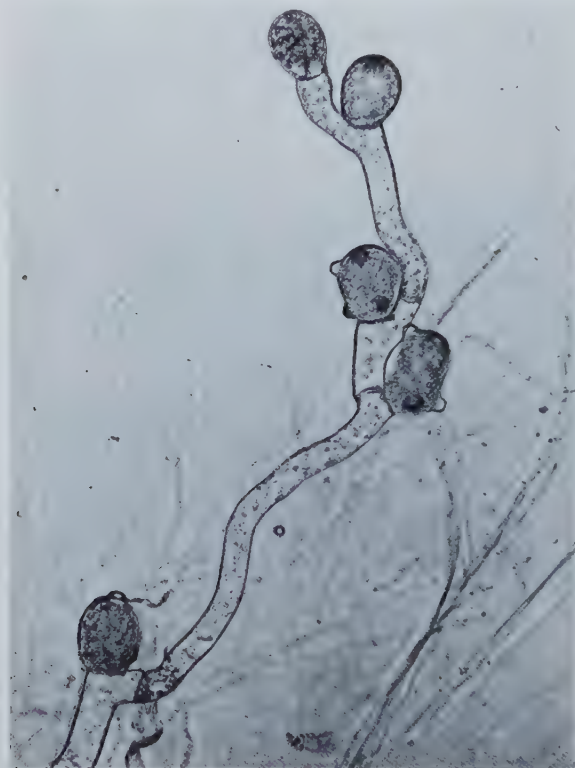


Abb. 4. BM 8. Männlicher Gametophyt. Die Hyphe trägt Mikrogametangien und an der Spitze ein junges Dauersporangium. Vergr. 200:1

Zur Lösung der Frage, um welchen Gametentyp es sich bei den Schwärmern handelte, wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt, und zwar BM 8 $\times$ nG (BM 8 als ♀) und reziprok. Im ersten Falle entwickelten sich nie Mycelien, obwohl sowohl die Gametangien als auch die BM 8-Organen zu 95% Schwärmer entließen. Im zweiten Falle aber konnte die Kopulation zwischen nG-Makrogameten und den BM 8-Schwärmern direkt beobachtet werden. Es entstanden Sporophyten von normalem Aussehen. Bei den BM 8-Schwärmern handelte es sich also um Mikrogameten.

Der Versuch wurde Smal wiederholt und führte immer zum gleichen Ergebnis. Die Sporophyten der Kreuzung ergaben auf

YpSs-Agar Dauersporangien, die nach 4 Wochen zu 35% keimten. Die Analyse der Gametophyten ergab folgende Werte:

Gametophyten mit Dauersporangien	:	Gametophyten normal	:	Gametophyten ♂ mit Dauersporangien	:	Gametophyten ♂ ohne Dauersporangien (Rekombinante)
MX 102	:	nG 118	:	BM 8 148	:	BM 8 o. D. 53
220				:	201	

Für eine angenommene 1:1-Spaltung wurde $\chi^2 = 0,86$ ($n = 1$) bei $p = 0,20$ bis 0,50 ermittelt, die Homogenität (FISHER) ist $\chi^2 = 4,18$ ($n = 7$) bei $p = 0,70$ bis 0,80.

Die Rekombinanten-Mycelien ohne Dauersporangien (BM 8 o. D.) erwiesen sich wie der BM 8-Elter bei mikroskopischer Durchmusterung als rein männlich. Der oben beschriebene Test führte zum gleichen Resultat.

Fünf auf Wachstumsgeschwindigkeit geprüfte Mycelien waren rascherwüchsig als normal (Tabelle 1, S. 525).

Die Kreuzung $nG \times BM\ 8$ o. D. (3 Sporophyten) ergab eine Spaltung von 249 nG :250 $BM\ 8$ o. D. Für eine angenommene 1:1-Spaltung wurde $\chi^2 = 0,002$ ($n = 1$) bei $p = 0,95-0,98$ ermittelt.

Diese Befunde beweisen, daß $BM\ 8$ sich durch 1 Gen vom Ausgangsstamm unterscheidet; wir nennen es „*mas*“ (*masculinus*).

Es blieb zu prüfen, ob sich das Versuchsmaterial auch bei sehr großer Individuenzahl noch als einheitlich erweisen würde, d. h. ob sich *alle* Gameten männlich verhalten würden. Zu diesem Zweck wurde $BM\ 8$ -Mycel auf YpSs-Agar geimpft, 6 Tage kultiviert und dann mit 4 cm^3 Aqua dest. überschichtet. Nach dem Ausschlüpfen der Gameten wurde die trübe Suspension in ein Röhrchen gegeben. Je $0,1\text{ cm}^3$ Suspension + 2 cm^3 Aqua dest. wurden dann auf 13 Schalen plattiert und diese bebrütet. Nach 3 Tagen waren auf den 13 Schalen insgesamt 141 Mycelien herangewachsen, die alle das Aussehen eines normalen Sporophyten zeigten.

Zur Bestimmung des Gehaltes an Gameten wurde die Suspension um 2 Zehnerpotenzen verdünnt. Von der letzten Verdünnungsstufe wurden Mengen von $0,01\text{ cm}^3$ auf Objektträger gegeben und nach Eintrocknenlassen bei mittlerer Vergrößerung und Phasenkontrast ausgezählt (im Mittel 400 Gameten je $0,01\text{ cm}^3$). Da $13 \times 0,1\text{ cm}^3$ Suspension, d. h. $13 \times 4 \times 10^5$ Gameten plattiert wurden und 141 sporophytische Mycelien entstanden, läßt sich aus dem Versuch der Schluß ziehen, daß auf 1 Sporophyten bzw. 1 lebensfähige Zygote $\frac{5,2 \times 10^6}{141} = 3,6 \times 10^4$ Gameten entfallen. In einem 2. Versuch 5 Monate später wurden auf 10 Schalen je 3×10^5 Gameten plattiert, es entstanden 23 Sporophyten, was einer Rate von $1:1,3 \times 10^5$ entspricht. Von 15 der insgesamt 163 erhaltenen Sporophyten wurden Meiosporen plattiert, die 1362 Mycelien ergaben. Diese trugen alle die typischen Merkmale des $BM\ 8$ -Eltermycels. Nach der gleichen Methode wurden von $BM\ 8$ o. D. auf 14 Schalen je $2,2 \times 10^5$ Gameten plattiert; es wuchsen 154 Sporophyten heran, was einer Rate von $1:2 \times 10^4$ entspricht. In einem späteren gleichartigen Versuch ergaben sich bei 10 Schalen (je 3×10^5 Gameten) nur 20 Sporophyten und demnach eine Rate von $1:1,5 \times 10^5$.

Die Wüchsigkeit von 20 in Kultur genommenen diploiden Sporophytenmycelien war normal; 60% der Dauersporangien entließen Sporen. Sie wuchsen zu Mycelien aus, die in allen typischen Merkmalen mit dem $BM\ 8$ o. D.-Elter übereinstimmten.

Die Befunde zeigen, daß in einer außerordentlichen niedrigen Rate sowohl beim $BM\ 8$ - als auch beim $BM\ 8$ o. D.-Mycel Zygoten entstehen können. In der Diskussion wird hierauf Bezug genommen werden.

4. Die Röntgenmutante *Sp 200*

Eine Suspension *diploider* Zoosporen (Titer 3×10^5 Sporen je cm^3) wurde bestrahlt und 1 cm^3 davon auf 10 Schalen verteilt. Während die Kontrollplatten nach 4 Tagen mit jungen nSp -Mycelien dicht bedeckt waren, ergaben die 10 Schalen mit bestrahlten Sporen nur 2 Sporophyten-Mycelien. Das eine der beiden erwies sich als normal, während das andere durch veränderte Dauersporangien

auffiel. Das Exospor normaler Dauersporangien von *Allomyces arbuscula* ist auf Lävulose-Pepton-Agar grau gefärbt. Bei der veränderten Form, Sp 200, zeigten

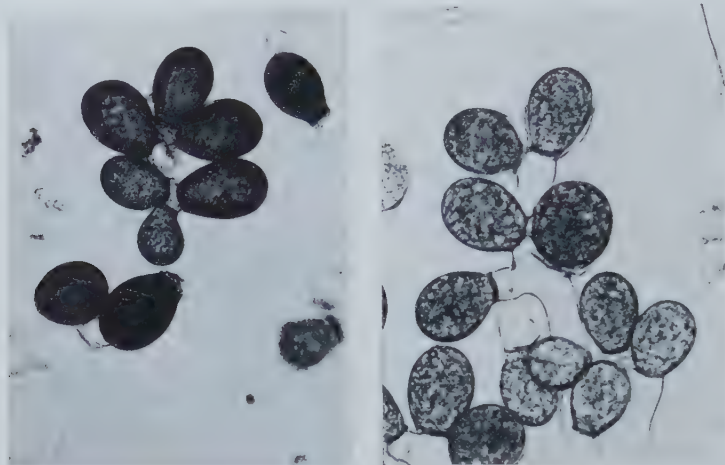


Abb. 5. Links Sp 200, Sporophyt mit dunklen Dauersporangien; rechts normaler Sporophyt (nSp). Vergr. 200:1

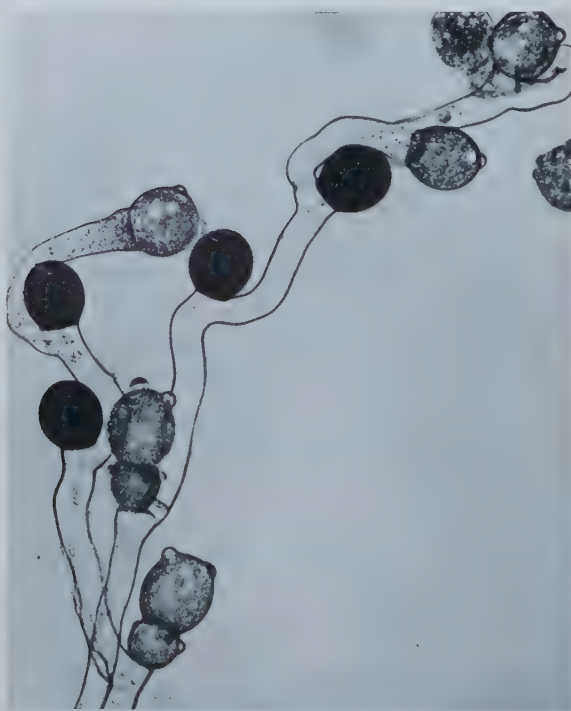


Abb. 6. MX 200, Gametophyt mit dunklen Dauersporangien; er ist hervorgegangen aus den Dauersporangien des Sp 200. Vergr. 200:1

die Dauersporangien jedoch auf diesem Medium eine dunkle, kastanienbraune Färbung, die über die Dauer der Versuche hinweg (79 Passagen) konstant blieb (Abb. 5 links). Auf YpSs-Agar wuchsen nSp und Sp 200 mit braunen Dauersporangien und waren dann morphologisch nicht mehr zu unterscheiden.

Die Wüchsigkeit von Sp 200-Mycel war etwas geringer als die von nSp (Tabelle 1, S. 525).

Aus Sp 200-Zoosporen wuchsen wieder, analog zu nSp, Sp 200-Mycelien aus.

80% der Dauersporangien von Sp 200 entließen nach 4 Wochen Sporen, die alle (Anzahl = 935) neben den normal ausgebildeten Gametangien auch Dauersporangien trugen. Diese

waren aber im Gegensatz zu den Dauersporangien des später beschriebenen normalen Mischgametophyten ebenfalls kastanienbraun wie die des diploiden

sporophytischen Ausgangsmycels (Abb. 6). Es fand also keinerlei Aufspaltung statt.

Zehn geselbstete Gametophyten („MX 200“) ergaben Sporophyten vom Aussehen des Sp 200 (Anzahl = 630).

Die genetische Analyse der ausgelösten abweichenden Form ist bisher noch nicht völlig durchgeführt; es liegen Hinweise auf eine plasmatische Erbkomponente vor. Aber schon jetzt scheint es bemerkenswert, daß durch die Bestrahlung diploider Fortpflanzungszellen eine genetisch fundierte Abweichung ausgelöst wurde, die sich sowohl im diploiden Sporophyten- als auch im haploiden Gametophytenmycel in gleicher Weise manifestiert.

5. Die Spontanmutante MX

Zu Beginn der Untersuchungen an *Allomyces* trat an einem nG-Mycel spontan ein Sektor auf, der gegenüber der übrigen Mycelfläche dunkler erschien. Bei näherer Betrachtung zeigte sich, daß die Hyphen innerhalb des Sektors nicht nur die in typischer Weise übereinanderstehenden Gametangien trugen (Abb. 7), sondern daneben auch noch birnenförmige Organe, die identisch mit den Dauersporangien des nSp schienen.



Abb. 7. Typische MX-Hyphe nahe der Wachstumsfront; auf die Bildung eines Gametangienpaares erfolgt Differenzierung von mehreren Dauersporangien. Vergr. 200:1

Die neu aufgetretenen Organe haben mit den Dauersporangien des Sporophyten eine sehr charakteristische Eigenschaft gemeinsam, nämlich die Fähigkeit, längere Zeiträume überdauern zu können. Damit verbunden ist die Notwendigkeit einer mehrwöchigen Reifeperiode (WILSON 1952, MACHLIS und OSSIA 1953a). Deshalb wird im folgenden der Name „Dauersporangien“ für die dickwandigen Organe des Gametophyten beibehalten, obwohl, wie unten gezeigt wird, eine Homologisierung mit den Dauerorganen des Sporophyten nicht angebracht erscheint.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden weitere Mischmycelien beobachtet. Weder bei ihnen noch bei dem zuerst gefundenen Mischgametophyten (MX), der über 124 Passagen völlig konstant blieb, wurde ein Umschlag zu Sporophyten- oder reinem Gametophytenmycel beobachtet.

Um zu prüfen, in welcher Anzahl MX-Mycelien aus Dauersporangien des normalen Sporophyten hervorgingen, wurden haploide Sporen plattiert. Da man unter der Masse der Gametangien bei einem MX-Mycel die Dauersporangien nicht immer auf den ersten Blick erkennen kann, wurde eine besondere Technik angewandt, um die Mycelien aufzuhellen. Dazu wurden nach 5 Tagen die inzwischen herangewachsenen Mycelien mit Leitungswasser überschichtet und die Schalen bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Gameten der vorzugsweise an der Oberfläche der Agars gebildeten Gametangien begannen auszuschwärmen; sobald dieser Prozeß einsetzte, wurde das Leitungswasser alle 30 min durch frisches ersetzt. Nach 3 Std war die überwiegende Anzahl der Gametangien leer, während eventuell vorhandene Dauersporangien sofort durch ihre dunkle Farbe zwischen den hyalinen Gametangien auffielen. Eine Verwechslung mit jungen Sporophytenmycelien war nicht möglich, da bei diesen die Dauersporangien in viel größerer Menge gebildet wurden.

Zur Erleichterung des Auszählens wurde die Petrischale auf eine Glasplatte gekittet, auf der parallele Linien im Abstand von 8 mm mit Tusche aufgetragen waren. Bei der schwachen Vergrößerung eines Stereomikroskopes (Leitz) konnte dann die Häufigkeit der MX-Mycelien anhand der Leitlinien bestimmt werden.

Während zu Beginn der Untersuchungen nur ganz vereinzelt Mischgametophyten — entstanden aus Dauersporangien ein und desselben vegetativ vermehrten nSp-Myceis — auftraten, nahm der Prozentsatz von MX-Mycelien im Laufe der Zeit zu:

Von 1209 Gametophyten waren am 22. 3. 56	116 MX = 9%
von 976 Gametophyten waren am 26. 3. 57	119 MX = 12%
von 1930 Gametophyten waren am 29. 8. 57	480 MX = 24%

Es fiel auf, daß die Bildung der Dauersporangien manchmal bei den MX-Mycelien in anscheinend „ungeordneter“ Reihenfolge geschah. Man konnte z. B. an einer Hyphe nur Dauersporangien (wie bei nSp), an einer anderen des gleichen Myceis dagegen ausschließlich Gametangien beobachten, oder unter vielen Gametangien fand sich ein einzelnes Dauersporangium. Um zu prüfen, inwieweit sich solche Hyphen bzw. Mycelien vielleicht auf dem Wege des „Umschlagens“ in einen Sporophyten bzw. Gametophyten befanden, wurden von einem MX-Mycel *einzelne* Hyphen, die Fortpflanzungsorgane nur *einer* Sorte trugen, aus dem Agar herauspräpariert und auf frisches Medium gebracht. In 13 Fällen wuchs die Hyphe an. Es wurde stets beobachtet, daß die übertragene Hyphe zu einem Gametophyten mit Dauersporangien auswuchs, auch wenn sie vorher etwa nur Dauersporangien getragen hatte. Damit konnte gezeigt werden, daß die getrennte Verteilung der Fortpflanzungsorgane nichts mit einer Kern- oder Plasma-Entmischung zu tun hat, sondern offenbar von äußeren Einflüssen abhängt. Aus diesem Grund dürfte auch eine Hyphe mit nur *einer* Art von Fortpflanzungsorganen noch als „gemischt“ angesprochen werden, sofern ihre Zugehörigkeit zu einem MX-Mycel feststand.

Für alle folgenden Versuche wurde stets von der äußersten Front des wachsenden MX-Myceis abgeimpft, da dort die Hyphen noch undifferenziert sind. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß das Sekundärmycel beim Überimpfen auf frisches Medium durch keimende Gametangien in MX und einen Sporophyten sektorierte.

Zu Beginn der entwicklungsgeschichtlichen und genetischen Analysen mußte die Kerngröße gemessen werden, um den Ploidiegrad des MX-Myceis bestimmen zu können. Dabei ergab sich:

1. Durchmesser der nSp-Kerne: $88,1 \pm 0,5$ Skalenteile (Anzahl = 299),
2. Durchmesser der nG-Kerne: $68,3 \pm 0,4$ Skalenteile (Anzahl = 290),
3. Durchmesser der MX-Kerne: $67,6 \pm 0,3$ Skalenteile (Anzahl = 306).

Der Unterschied von 1 und 2 ist mit einem $p < 0,0001$ gesichert, dagegen sind 2 und 3 statistisch gesichert gleich groß. Damit ist bewiesen, daß der Mischgametophyt haploid ist wie der normale Gametophyt (Abb. 8). Die Kernmessungen wurden übrigens auch in solchen MX-Hyphen vorgenommen, die ausschließlich von Dauersporangien besetzt waren. Die Tatsache, daß auch diese Hyphen nur haploide Kerne enthielten, stimmt mit dem beschriebenen Auswachsen solcher Hyphen zu einem gemischten Mycel gut überein.

Es galt nun festzustellen, welcher Art die aus MX-Dauersporangien eventuell entstehenden Mycelien sein würden. Zu diesem Zweck wurde MX auf YpSs-Schrägröhrchen geimpft. Die nach 4 Wochen abgenommenen und in Wasser gebrachten Dauersporangien keimten in derselben Weise, wie es für nSp-Dauersporangien beschrieben wurde. Auch die austretenden Sporen hatten

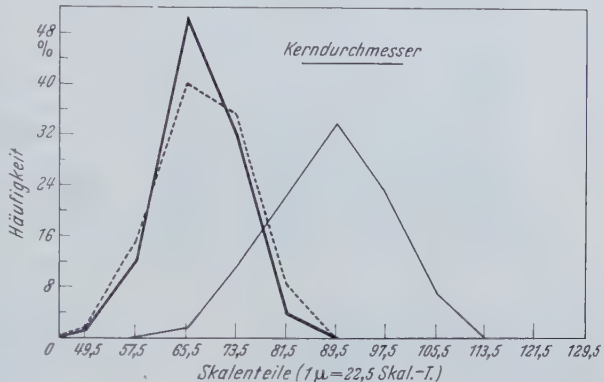


Abb. 8. Vergleich der Kerngrößen von MX mit nG ----- und nSp —————

gleiche Größe und Gestalt wie die des Sporophyten. Sie setzten sich, auf Agar übertragen, fest und wuchsen zu Gametophyten aus. Diese erwiesen sich alle als MX-Mycelien (Anzahl = etwa 3000).

Dieser Befund läßt sich so deuten, daß der für *Allomyces arbuscula* „normale“ Generationswechsel beim Mischgametophyten unterbrochen ist. Die diploide, vegetative Phase des Sporophyten kann dadurch, daß der Gametophyt eigene Überdauerungsorgane bildet, ausfallen, und es entsteht hierdurch ein eigener Fortpflanzungszyklus: Gametophyt—Dauersporangium—Spore—Gametophyt.

Der Ausfall der Sporophytengeneration bei MX war jedoch nicht obligatorisch. Selbstungsversuche am MX-Gametophyten zeigten, daß die Gameten normal kopulierten, und daß normal erscheinende Sporophyten aus den Zygoten hervorgingen.

Aus den Dauersporangien dieser Selbstungs-Sporophyten entstanden wieder ausschließlich MX-Mycelien. Dies machte wahrscheinlich, daß es sich bei der Ausbildung der Eigenschaft „gemischt“ um ein genetisch fixiertes Merkmal handelt.

Zur Klärung dieser Frage wurden Kreuzungen mit nG angestellt:

1. nG $\times$ MX; 2. MX $\times$ nG.

Kreuzung 1 ergab in der F_1 die Spaltung: nG:MX = 447:487.

Für eine angenommene 1:1-Spaltung ergab sich $\chi^2 = 1,7$ ($n=1$), wofür ein $p=0,1-0,2$ ermittelt wurde. Die reziproke Kreuzung 2 spaltete: MX : nG = 438:468. Für eine angenommene 1:1-Spaltung ergaben sich $\chi^2 = 0,98$ ($n=1$) und $p=0,20-0,50$.

Die Befunde führen zum Schluß, daß MX sich durch 1 Gen vom Wildstamm unterscheidet. Es erhält die Bezeichnung „mix“ (*mixta*).

Gametangien des nG und Dauersporangien des nSp sind ihrer Entstehung und Funktion nach sehr verschiedene Fortpflanzungsorgane (EMERSON und

WILSON 1949). Da die Reduktion des diploiden Genoms in normalen Dauersporangien abläuft und da im Verlauf dieser Untersuchungen festgestellt wurde, daß das MX-Mycel haploid ist, war es wünschenswert, die Cytologie der MX-Dauersporangien aufzuklären.

Diese konnte jedoch erst angegangen werden, nachdem anhand der Untersuchung des Meiose-Ablaufes in nSp-Dauersporangien Klarheit über Größenordnung und Lagebeziehung



Abb. 9. Anaphase I im nSp-Dauersporangium. Vergr. 3000:1. Rechts Schemadarstellung

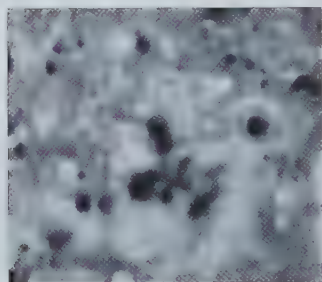


Abb. 10. Metaphasenplatte aus MX-Dauersporangium, Flächenansicht; Vergr. 3000:1. Rechts Schemadarstellung



Abb. 11. Metaphasenplatte aus MX-Dauersporangium, Kantenansicht; Vergr. 3000:1

der Chromosomen gewonnen worden war. Bei den Färberversuchen (nach WILSON 1952) ergaben sich beträchtliche Schwierigkeiten, und zwar sowohl mit nSp- als auch mit MX-Dauersporangien.

Während die Meiose I im nSp-Dauersporangium zwischen der 35. und 70. min nach Einbringen des Materials in Wasser abläuft (WILSON 1952, EMERSON 1955), wurden in den MX-Dauersporangien die ersten Teilungen erst nach der 70. min beobachtet. Die Metaphasenplatten zeigten 8 Chromosomen. Aus der Anzahl und Größe der Chromosomen konnte geschlossen werden, daß es sich bei den im MX-Dauersporangium ablaufenden Teilungen um Mitosen handelt (Abb. 9—11).

IV. Zwergmycelien

Unter den bei den Bestrahlungsexperimenten auswachsenden Gametophytenmycelien fanden sich in einem Prozentsatz von 3—5% auch schwächerwüchsige Formen, und zwar sowohl in den Kontrollen als auch in den Versuchen. Der Grad der Wachstumshemmung reichte von einer geringen Beeinträchtigung (verbunden mit leichter Vermännlichung) bis zu einer völligen Sistierung des Wachstums in frühen Stadien der Mycelbildung. Bei Kernmessungen stellte sich heraus, daß es sich bei diesen Formen um Polyploide handelte.

Da ein Zusammenhang zwischen den Zwergmycelien und den in Sporensuspensionen vereinzelt erscheinenden Riesensporen zu bestehen schien, wurden zur Klärung dieser Annahme Versuche angestellt. Von 16 isolierten Riesensporen wuchsen nur zwei zu normalen Gametophyten heran, neun gingen ein, vier Sporen bildeten kugelige Blasen mit Rhizoiden, jedoch

ohne Hyphen, und eine Spore wuchs zu einem diploiden Zwerggametophyten aus. In einem weiteren Experiment wurden Dauersporangien in einem Tropfen Aqua dest. eingebracht. Nach 40 min wurden 73 stark gequollene Dauersporangien mit einer Kapillarpipette entnommen und ohne Wasser auf Lävulose-Pepton-Agar gebracht. Es entstanden 6 Mycelien von nG, 58 Sporangien keimten nicht bzw. es bildeten sich um sie herum blasige Schläuche, die bald eingingen, und 9 Zwergmycelien. Bei einigen erreichte die anfangs stark verringerte Wachstumsgeschwindigkeit im Laufe von 3 Passagen den Normalwert, während andere schwachwüchsig blieben. Bei einem der schwachwüchsigen diploiden Gametophyten wurde durch Selbstungsversuche ein Sporophyt gewonnen, dessen Kerne tetraploid waren (Abb. 12). Aus den Experimenten kann geschlossen werden, daß bei der normalen Meiose Störungen eintreten können, die zur Bildung von Polyploiden führen. Möglich sind: 1. Ausfall der Reduktion. 2. Plasma- und Kernverschmelzung von 2 Sporen.

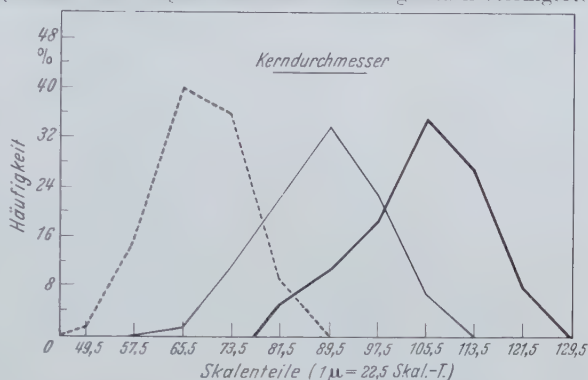


Abb. 12. Vergleich der Kerngrößen des geselbsteten Zwergmycels *SpM 3* (Sporophyt, dick ausgezogene Kurve) mit *nG* und *nSp*. Anzahl = 125, Durchmesser der Kerne $104,2 \pm 0,8$ Skalenteile

V. Diskussion

1. Morphologie der Mutanten; Abweichungen vom normalen Entwicklungszyklus

Während es in der Reihe der *Blastocladales* Arten mit männlichen und weiblichen Gametophyten gibt — z. B. bei *Blastocladiella Stübenii* (STÜBEN 1939) — sind die meisten anderen Arten streng monözisch. FOLEY (1957) untersuchte rein weibliche Mycelien von *Allomyces arbuscula*, Stamm *Brazil 2*, die als Folge von UV-Bestrahlung oder spontan auftraten; er fand, daß bei diesem Stamm für die Vererbung der Pigmentierung nichtmendelnde Faktoren verantwortlich sind. Ein männliches Mycel war bisher nicht bekannt.

Die Röntgenmutante BM 8 ist ein männlicher Gametophyt, denn seine Gameten kopulieren mit Makrogameten des normalen Gametophyten, nicht aber mit Mikrogameten. Bei Selbstungsversuchen traten Sporophyten erst bei den sehr hohen Konzentrationen von $3,6 \times 10^4$ bzw. $1,3 \times 10^5$ Gameten je cm^3 auf. Diese Erscheinung läßt sich nur durch die Annahme einer äußerst selten erfolgenden Bildung einzelner Makrogameten erklären; eine Kopulation zweier Mikrogameten wurde weder in eigenen Experimenten noch von anderen Beobachtern (SÖRGEL 1937, EMERSON 1941, SOST 1955) gefunden. Trotz sorgfältiger mikroskopischer Untersuchung wurde keine Sektorierung am Mycel beobachtet, für die eine Rückmutation hätte verantwortlich gemacht werden können. Man kann daher das Vorkommen von Makrogameten nicht auf einen solchen Vorgang zurückführen; außerdem wurden nie farblose Gametangien gefunden, die reiften und sich entleerten. Das Vorkommen gefärbter Makrogametangien jedoch ist nach allem, was bisher über Geschlechtsdifferenzierung und Karotinsynthese bei *Allomyces* bekannt ist (EMERSON und FOX 1940, FOLEY 1957), auszuschließen.

Die Mutanten M 70 und M 183f tragen an den Hyphen häufig einzelne Mikrogametangien. Es scheint, daß diese Tendenz zur „Vermännlichung“ bei *Allomyces*

verbreitet ist, denn auch die diploiden gametophytischen Zwergmycelien erscheinen vermännlicht. Das gleiche berichtet SOST (1955) von colchicinierten Gametophyten.

Das Problem des „Mischmycels“, 1935 von HATCH erwähnt und 1937 von SÖRGE beschrieben, erscheint in fast allen späteren Arbeiten, die sich mit der Morphologie von *Allomyces* beschäftigen (HATCH 1944, BENEKE und WILSON



Abb. 13. Entwicklungszyklus des MX-Mycels, halbschematisch. Großer Zyklus: Zygote—Sporophyt (Reduktion)—Gametophyt—Zygote. Kleine Zyklen: 1. Sporophyt (Mitose)—Diplospore—Sporophyt; 2. Dauersporangium am MX-Gametophyten (keine Reduktion)—Haplospore—MX-Gametophyt

1950, EMERSON 1950, 1955, EMERSON und WILSON 1954, WHIFFEN 1951). Die Autoren heben die merkwürdige Tatsache hervor, daß ein (haploider) Gametophyt Organe zu bilden vermag, die ihrem Aussehen und ihrer Keimungsphysiologie nach nicht von den Dauersporangien des (diploiden) Sporophyten zu unterscheiden sind. In den sporophytischen Dauerorganen läuft, wie WILSON (1949, 1952) bewiesen hat, die Reduktion des diploiden Genoms ab. HATCH (1944) berichtet, daß normale Gametophyten aus den Dauersporangien seines Mischgametophyten hervorgehen. Das hier beobachtete Mischmycel verhielt sich anders. Aus Dauersporangien des MX-Gametophyten entstehen ausschließlich gemischte Gametophyten. Die Selbstung des MX-Mycels ergibt normal erscheinende Sporophyten, aus deren Dauerorganen wieder zu 100% MX-Mycelien hervorgehen (Abb. 13). Der große Zyklus des Generationswechsels ist: Zygote—Sporophyt (Meiose)—Gametophyt—Zygote. Daneben bestehen zwei kleine

Zyklen: 1. Sporophyt (Mitose)—Diplospore—Sporophyt und 2. Dauersporangium am MX-Gametophyten—Haplospore—MX-Gametophyt. Dieser 2. Nebenzyklus des Gametophyten mit dem Ausfall der vegetativen Generation hat eine gewisse Parallele bei *Allomyces anomalus* EMERS., aus dessen Sporophyten—Dauersporangien stets wieder (unter Umgehung der Meiose!) Sporophyten entstehen, ohne daß es zur Ausbildung einer Gametophyten-Generation käme (EMERSON 1941).

SÖRGEL (1937) beobachtete an seinem *Allomyces arbuscula*-Stamm, daß gemischte Mycelien im Laufe ihrer Entwicklung stets zu Gametophyten oder Sporophyten werden, daß sie also instabil sind. Ferner stellte er Kernmessungen am Mischmycel an und fand, „daß einem „Durcheinander von Fortpflanzungsorganen“ an einer Hyphe auch eine Mischung von haploiden und doppelt so großen diploiden Kernen entspricht“ (S. 445). In unseren Versuchen wurde dagegen weder ein Wechsel von reinem Sporophyt über MX zu reinem Gametophyt noch der umgekehrte Vorgang beobachtet. Schließlich zeigten Messungen an lebenden Kernen, daß der Dauersporangien tragende Gametophyt ein einheitlich haploides Mycel darstellt. Dieser Befund konnte von FÄHRICH (mündliche Mitteilung) bestätigt werden.

Unter einem solchen Aspekt schien die Cytologie der MX-Dauersporangien von Interesse. Wie im allgemeinen Teil beschrieben, stieß die Färbung der Chromosomen nach WILSON auf besondere Schwierigkeiten. ZIEGLER (1953), der die Meiose von *Saprolegniaceen* untersuchte, erwähnt ähnliche Hindernisse mit der gleichen Methode. Bei unseren Experimenten konnten jedoch in mehreren Fällen Teilungsstadien in MX-Dauersporangien analysiert werden. Während die ersten Teilungen im normalen Dauersporangium zwischen der 35. und 70. min ablaufen, wurden sie in den MX-Dauersporangien erst zwischen der 90. und 100. min gefunden. Die beobachteten Teilungsbilder waren von denen des normalen Dauersporangiums verschieden. Hieraus konnte geschlossen werden, daß es sich bei den Vorgängen, die im MX-Dauersporangium ablaufen, um Mitosen handelt. Nach dem, was bisher über Kernverhältnisse bei Phycomyceten bekannt ist (SPARROW 1943, OLIVE 1953), war es auch nicht zu erwarten, daß haploide Kerne miteinander verschmelzen (ohne Zygotenbildung), um dann in die Meiose einzutreten.

2. Die Genetik der Mutanten

Die Mutante BM 8 muß als Genmutante gedeutet werden, denn die Rückkreuzung nG $\times$ BM 8 ergibt eine klare 1:1-Spaltung (220:201 und 249:250). Man darf annehmen, daß in jedem der haploiden Kerne des normalen Gametophyten geschlechtsbestimmende Gene (oder Genkomplexe) lokalisiert sind. Während der Gametangien-Entwicklung, die durch äußere oder innere Bedingungen induziert wird, bewirken diese „Realisatoren“ (v. WETTSTEIN 1924) für männlich und weiblich die polare Differenzierung in Mikro- und Makrogameten. Zur Ausbildung der beiden Gametentypen sind komplizierte Stoffwechselprozesse erforderlich (CANTINO und HYATT 1953a, b, c; CANTINO und HORENSTEIN 1956, 1957 bei *Blastocladiella*). Wahrscheinlich ist durch die Röntgenbestrahlung eines der Gene mutiert, die in diese Stoffwechselvorgänge steuernd eingreifen. Während die im normalen Gametophyten zur Gametangienbildung führenden physiologischen

Prozesse so ausbalanciert sind, daß Mikro- und Makrogametangien zu gleichen Teilen entstehen, kann unter dem Einfluß des mutierten Gens das Gleichgewicht zugunsten der Mikrogametangien verschoben sein.

In der Röntgenmutante Sp 200, einem Sporophyten mit abweichend dunklen Dauersporangien, konnte zunächst ein Fall von „dominanter Mutation“ vermutet werden. Die Annahme, daß zwei allele Loci gleichzeitig und in gleicher Richtung mutiert seien, war in hohem Maße unwahrscheinlich. Die Analyse der aus dem Sporophyten hervorgehenden haploiden Gametophyten zeigte aber, daß alle Gametophyten (sie waren gemischt) dunkle Dauersporangien trugen wie der Sp 200. Dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme einer Mutation zu einem über das normale Gen dominanten Allel, denn in diesen Fall müßte man eine 1:1-Spaltung erwarten. Eine gewisse Erklärungsmöglichkeit bietet jedoch die Annahme einer plasmatischen Übertragung des Merkmals „dunkel“.

Bei dem spontan aufgetretenen Mischgametophyten MX sind die Vererbungsverhältnisse wesentlich klarer. Hier entspricht das Ergebnis der Rückkreuzung mit nG (447:487 und 438:468) einer 1:1-Erwartung. Das zeigt, daß 1 Gen für das Merkmal „Dauersporangien am Gametophyt“ verantwortlich ist.

SÖRGEL (1937) gibt an, daß eine Zunahme der aus Dauersporangien des Sporophyten entstehenden Mischmycelien im Laufe seiner Untersuchungen zu beobachten war. Diese Befunde decken sich mit den eigenen Ergebnissen. Sie lassen vermuten, daß der *mix*-Locus durch eine hohe Mutationsfrequenz ausgezeichnet ist. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß die MX-Sektoren in nG-Mycel mit einer Häufigkeit von etwa 1% auftraten. Wenn man annimmt, daß im diploiden Mycel Kerne mit einer relativ hohen Häufigkeit von ++ nach +*mix* mutieren und die mutierten gegenüber den nichtmutierten Kernen keinen Selektionsnachteil zeigen, so muß im Laufe der Zeit eine allmähliche Verschiebung im Verhältnis der beiden Kerntypen zueinander auftreten. Die Chance, daß +*mix*-Kerne in eine Dauersporangiumanlage gelangen, wird zunehmen. Folglich wird auch der Anteil der *mix*-tragenden Meiosporen (durch Meiose im Dauersporangium entstanden) größer und das Zahlenverhältnis normal:gemischt bei den aus den haploiden Meiosporen hervorgehenden Gametophyten zugunsten der gemischten Gametophyten verschoben sein. Möglicherweise spielt bei der Zunahme von +*mix*-Kernen auch das beständige Abimpfen auf frischen Nährboden als selektionierender Faktor eine Rolle.

3. Zwergmycelien

Bei der Untersuchung der schwachwüchsigen Abweicher (entstanden aus haploiden Sporen) konnte durch Kernmessungen gezeigt werden, daß es sich hierbei um Polyploide handelte. Die Kernmessung ohne Vergleich mit den entsprechenden Chromosomenzahlen wurde für ausreichend erachtet, da bereits KNIPE (1930) und SÖRGEL (1937) ein 1:2-Verhältnis der Volumina von Gametophyten-:Sporophytenkernen gefunden hatten. SOST (1955) konnte darüber hinaus zu den beiden Kerntypen die entsprechenden Chromosomenzahlen feststellen. Es besteht daher kein Anlaß, die durch Kernmessung gewonnene Aussage über die Ploidiestufe eines Mycels in Frage zu stellen. Die Erklärung für das eigenartige

Phänomen der beobachteten Polyploidisierung ist wohl in einer Störung der Meiose im Dauersporangium zu suchen. Es ist anzunehmen, daß der unter Normalverhältnissen relativ seltene Vorgang einer unvollständigen Meiose (und damit verbunden die Bildung von diploiden Sporen) unter bestimmten äußeren Bedingungen häufiger abläuft. Eine solche Bedingung ist offenbar das Keimenlassen von Dauersporangien auf feuchtem Agar ohne Wasserzugabe. Der außerordentlich starre Determinationsprozeß, der im Dauersporangium abläuft, wird dadurch nicht gestört; es entsteht in jedem Fall ein Gametophyt, ungeachtet der auf ihn entfallenden Genomzahl. Durch diesen Befund werden die Untersuchungen SOSTS (1955) bestätigt, der diploide Gametophyten mit Hilfe einer Colchicinbehandlung der Dauersporangien erzeugen konnte. Möglicherweise liegt den Beobachtungen SÖRGELS (1936), der über spontan aufgetretene heteroploide „Mutanten“ bei *Allomyces* berichtet, das gleiche Phänomen zugrunde.

Zusammenfassung

1. Bei *Allomyces arbuscula* BUTL., einem Phycomyceten mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung, wurden Röntgenmutanten mit veränderten Fortpflanzungsmerkmalen erzeugt.

2. Die Mutante BM 8 ist ein männlicher Gametophyt. Durch Kreuzungsexperimente wurde gezeigt, daß 1 Gen (*mas*) für den Ausfall des weiblichen Geschlechts verantwortlich ist.

3. Das Mischmycel (Gametophyt mit Dauersporangien) ist ein haploider Gametophyt.

4. Für die Ausbildung der Dauersporangien am Gametophyten ist 1 Gen (*mix*) verantwortlich.

5. Durch die Beobachtung, daß aus den Dauersporangien des Misch-Gametophyten wieder Misch-Gametophyten entstehen, konnte ein neuer Nebenzyklus für *Allomyces arbuscula* gefunden werden.

6. Durch die Untersuchung der Cytologie der gametophytischen Dauersporangien konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß es sich bei den darin ablaufenden Teilungsvorgängen um Mitosen handelt.

7. Polyploide Gametophyten konnten ohne spezifische Chemikalien erzeugt werden.

8. Die Bedeutung der analysierten Abweichungen für den Entwicklungszyklus von *Allomyces* wird diskutiert.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden im Botanischen Institut der Universität Köln von Januar 1954 bis Oktober 1957 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. J. STRAUB, danke ich für die Überlassung des Themas und für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. F. LINSKENS und Herrn Dr. K. ESSER danke ich für freundlich erteilte Hinweise und anregende Diskussionen.

Literatur

AMBROSIOUS, H.: Über die Genauigkeit und zeitliche Rentabilität von Zellkernmessungen. *Mikroskopie* 8, 95—102 (1953). — BARRETT, J. T.: The development of *Blastocladia strangulata* n. sp. *Bot. Gaz.* 54, 353—371 (1912). — BENEKE, E. S., and G. B. WILSON: Treatment of *Allomyces javanicus* var. *japonensis* INDOH with colchicine and sodium nucleate. *Mycologia*

- (N. Y.) **42**, 519—522 (1950). — BUTLER, E. J.: On *Allomyces*, a new aquatic fungus. Ann. Botany **25**, 1023—1034 (1911). — CANTINO, E. C., and E. HORENSTEIN: Gamma and the cytoplasmic control of differentiation in *Blastocladiella*. Mycologia (N. Y.) **48**, 443—446 (1956). — CANTINO, E. C., and M. T. HYATT: Phenotypic "sex" determination in the life history of a new species of *Blastocladiella*, *B. emersonii*. Antonie v. Leeuwenhoek **19**, 25—70 (1953a). — Carotenoids and oxydative enzymes in the aquatic Phycomycetes *Blastocladiella* and *Rhizophlyctis*. Amer. J. Bot. **40**, 688—694 (1953b). — Further evidence for the role of the tricarboxylic acid cycle in morphogenesis in *Blastocladiella emersonii*. J. Bact. **66**, 712—720 (1953c). — CANTINO, E. C., J. and LOVETT, E. HORENSTEIN: Chitin synthesis and nitrogen metabolism during differentiation in *Blastocladiella emersonii*. Amer. J. Bot. **44**, 498—505 (1957). — COKER, W. C.: Notice on the cell wall of *Allomyces arbuscula* (with a plate of A. COUCH). J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **46**, 119 (1930). — EMERSON, R.: A new life cycle involving cyst-formation in *Allomyces*. Mycologia (N. Y.) **30**, 120—132 (1938). — An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia **4**, 77—144 (1941). — Current trends of experimental research on the aquatic *Phycomycetes*. Ann. Rev. Microbiol. **4**, 169—200 (1950). — The biology of water molds; in: Aspects of synthesis and order in growth, p. 171—208. Princeton: University Press 1955. — EMERSON, R., and D. L. FOX: γ -carotene in the sexual phase of the aquatic fungus *Allomyces*. Proc. roy. Soc. B **128**, 275—293 (1940). — EMERSON, R., and C. M. WILSON: The significance of meiosis in *Allomyces*. Science **110**, 86—88 (1949). — Interspecific hybrids and the cytogenetics and cytotoxicity of *Euellomyces*. Mycologia (N. Y.) **46**, 393—434 (1954). — FOLEY, J. M.: Mechanisms of heredity and differentiation in *Allomyces*. Summary of the thesis, published at the University of California 1957. — HATCH, W. R.: Sexuality of *Allomyces arbuscula* BUTL. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **49**, 163—170 (1933). — Gametogenesis in *Allomyces arbuscula*. Ann. Botany **49**, 623—649 (1935). — Conjugation and zygote germination in *Allomyces arbuscula*. Ann. Botany N. S. **2**, 583—614 (1938). — Resistant sporangia on sexual plants of *Allomyces arbuscula*. Mycologia (N. Y.) **36**, 309—311 (1944). — Zoosporogenesis in the resistant sporangia of *Allomyces arbuscula*. Mycologia (N. Y.) **36**, 650—663 (1944). — HATCH, W. R., and R. C. JONES: An experimental study of alternation of generations in *Allomyces arbuscula*. Mycologia (N. Y.) **36**, 369—381 (1944). — INGRAHAM, J. L., and R. EMERSON: Studies of the nutrition and metabolism of the aquatic Phycomycete *Allomyces*. Amer. J. Bot. **41**, 146—152 (1954). — KNIPE, H.: *Allomyces javanicus* n. sp., ein anisogamer Phycomycet mit Planogameten. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 199—212 (1929). — Über den Generationswechsel von *Allomyces*. Z. Bot. **22**, 433—441 (1930). — LA COUR, L.: Acetic-Oreicin. Stain Technol. **16**, 169—174 (1941). — MACHLIS, L.: Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euellomyces*. I. Growth factor requirements. Amer. J. Bot. **40**, 189—195 (1953a). — Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euellomyces*. II. Optimal composition of the minimal medium. Amer. J. Bot. **40**, 450—460 (1953b). — Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euellomyces*. III. Carbon sources. Amer. J. Bot. **40**, 460—464 (1953c). — MACHLIS, L., and E. OSSIA: Maturation of the meiosporangia of *Euellomyces*. I. The effect of cultural conditions. Amer. J. Bot. **40**, 358—365 (1953a). — Maturation of the meiosporangia of *Euellomyces*. II. Preliminary observations on the effect of auxins. Amer. J. Bot. **40**, 465—468 (1953b). — OLIVE, L.: The structure and behavior of fungus nuclei. Bot. Review **19**, 439—586 (1953). — QUANTZ, L.: Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie einiger niederer Phycomyceten, Jb. wiss. Bot. **91**, 120—168 (1943). — RIZET, M. G.: Sur l'impossibilité de obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'Ascomycète *Podospora anserina*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **237**, 838—840 (1953a). — Sur la longévité des souches de *Podospora anserina*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **237**, 1106—1109 (1953b). — SÖRGE, G.: Über heteroploide Mutanten bei *Allomyces kniepii*. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl., N. F. Fachgr. 6 Biol. **2**, 155—170 (1936). — Untersuchungen über den Generationswechsel von *Allomyces*. Z. Bot. **31**, 401—446 (1937). — SOST, H.: Über die Determination des Generationswechsels von *Allomyces arbuscula* BUTL. Arch. Protistenk. **100**, 541—564 (1955). — SPARROW, F. K.: Aquatic Phycomycetes exclusive of the *Saprolegniaceae* and *Pythium*. Ann. Arbor: University Michigan Press 1943. — STRÜBEN, H.: Über Entwicklungsgeschichte und Ernährungsphysiologie eines neuen niederen Phycomyceten mit Generationswechsel. Planta (Berl.) **30**, 353—383 (1939). — TETER, H. E.: Isogamous sexuality in a new strain of *Allomyces*. Mycologia (N. Y.) **36**,

194—210 (1944). — TURIAN, G.: L'acide borique, inhibiteur de la copulation gamétique chez *Allomyces*. *Experientia* (Basel) **10**, 498—499 (1954). — Recherches sur l'action anticarotinogène de la diphenylamine et ses conséquences sur la morphogénèse reproductive chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Physiol. Plantarum* (Cph.) **10**, 667—680 (1957). — WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik. Jena 1956. — WETTSTEIN, F. v.: Morphologie und Physiologie des Formenwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. I. Z. induct. Abstamm.-u. Vererb.-Lehre **33**, 1—236 (1924). — Über Fragen der Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* **12**, 761 (1924). — WHIFFEN, A. J.: The effect of cycloheximide on the sporophyte of *Allomyces arbuscula*. *Mycologia* (N. Y.) **43**, 635—644 (1951). — WILSON, C. M.: Meiosis in relation to the maturation and germination of resistant sporangia in *Allomyces*. *Amer. J. Bot.* **36**, 817 (1949). — Meiosis in *Allomyces*. *Bull. Torrey bot. Club* **79**, 139—160 (1952). — ZIEGLER, A. W.: Meiosis in *Saprolegniaceae*. *Amer. J. Bot.* **40**, 60—66 (1953).

Dr. CLAUDIUS STUMM, R. K. Universiteit Nijmegen (Niederlande),
Laboratorium voor algemene biologie en erfelijkheidsleer, Kapittelweg 40

THE EXPRESSION OF MUTATIONS IN COMMON-*A* HETEROKARYONS OF *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE**

By

JOHN R. RAPER, JAMES P. SAN ANTONIO and PHILIP G. MILES

With 2 Figures in the Text

(Eingegangen am 7. Juni 1958)

A. Introduction

The relationship between the incompatibility mechanism and heterokaryosis in a typical hymenomycetous fungus was first apparent from the work of PAPA-ZIAN (1950), who provided preliminary descriptions of two novel types of heterokaryons, "flat" and "barrage", in the common, wood-rotting, tetrapolar mushroom, *Schizophyllum commune*. Proof of heterokaryosis as the product of interaction between homokaryotic mycelia having common factors at the *A* incompatibility "locus" and a more detailed description of the common-*A*, or "flat", heterokaryon were subsequently given by RAPER and SAN ANTONIO (1954). This type of heterokaryon, dependent upon a specific combination of incompatibility factors that is possible only in forms having a bifactorial incompatibility mechanism, was shown to differ in several important respects from heterokaryons of all types heretofore known. The chief distinguishing characteristics of the common-*A* heterokaryon are the following: 1. The mode of formation is such that there are formed, from a single mating of two homokaryotic mycelia, two specific and stable heterokaryons which contain nuclei of the two component types in marked, and in essentially reciprocal, numerical disparity. 2. An interaction between the two component nuclear types results in an almost complete failure of genetic complementation between the two genomes and seriously impairs the general metabolic activities of the mycelium.

In addition to these unusual characteristics, mutants of a few specific types regularly come to visible expression in high frequency in the common-*A* heterokaryon. This phenomenon, also originally observed by PAPA-ZIAN (1950), was termed *heterokaryotic mutagenesis* by RAPER and SAN ANTONIO (1952), and has been described in broad outline by RAPER (1953).

At the time the term was first applied, the available evidence was interpreted as indicating the operation of an automutagenic process; continued study, however, has failed to provide conclusive proof of the existence of a specific mutagenic effect. By the same token, such mutagenesis has not been discounted as a possible source of the few mutant types so regularly expressed in the common-*A* heterokaryon. The authors appreciate the greater interest in the origin of the mutants than in the details of their expression and have accordingly sought throughout the exploratory studies reported here for definitive information that

* These studies were largely conducted at the University of Chicago, Chicago, Ill., and have been supported by grants from the Wallace C. and Clara A. Abbott Memorial Fund of the University of Chicago, The Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service, and the National Science Foundation.

would permit of a clean choice between three alternative early histories of the expressed mutants: a) spontaneous mutation and preferential selection of a few mutant types, b) a general increased mutation rate and preferential selection of a few mutant types, and c) an automutagenic process affecting only a few specific loci. Work on the problem of the origin of the mutants is being continued.

The present paper deals primarily with a detailed description of the expression of mutations in common-*A* heterokaryons of *S. commune* and the results of studies on certain factors which critically affect the relative abundance, time of appearance, and types of mutants expressed. Other related matters, such as the morphological, physiological, and genetic characterization of the mutants will be treated in a subsequent account.

B. Materials and methods

The specific use of a number of terms having definite genetic implications, such as *stock*, *strain*, *substrain*, *mating type* and *het-mutant* (a limited number of mutant types appearing *de novo* in heterokaryons), and an arbitrary system of designations for the various types of heterokaryons have been described elsewhere (RAPER and SAN ANTONIO 1954). The terminology for common-*A* heterokaryosis must necessarily be repeatedly employed here and consequently deserves brief review: in the mating of two homokaryons having common *A* incompatibility factors, e.g., $A^1B^1 \cdot A^1B^2$, the sum of their interaction is designated $[A^1B^1:A^1B^2]$ and the two specific and reciprocally constituted heterokaryons are designated $[A^1B^1(A^1B^2)]$ and $[A^1B^2(A^1B^1)]$.

The biological materials employed in this study were derived from wild fruiting bodies collected at Chicago, Ill., Upper Jay, N. Y., Lake Geneva, Wis., and Big Sur, Calif. Monosporous progeny from these original stocks and from various laboratory crosses have been used.

Certain special techniques, which supplement the routine procedures previously employed (RAPER and SAN ANTONIO 1954), deserve brief description.

Heterokaryons grown and maintained on a semisolid medium in Petri-dishes were extensively used for the following purposes: 1. observations relating to the time of appearance, the growth, and the morphology of het-mutants *in situ*, 2. isolation of het-mutants under circumstances in which certain quantitative relationships needed to be preserved, and 3. the comparison of relative expression of het-mutants in different heterokaryons or in the same heterokaryon under different conditions. Each culture was initiated either by juxtaposed inocula of two appropriate strains, for paired heterokaryons, or by a single inoculum of a previously established, specific heterokaryon. Cultures maintained in Petri-dishes over long periods (up to 16 weeks) were commonly protected against desiccation and contamination by sealing the plates with paraffin or beeswax.

Although the isolation of het-mutants directly from the heterokaryon growing upon agar medium is perfectly feasible, such procedure typically involved one or more re-isolations to effect certain separation from normal elements of the heterokaryon. In an easier method of isolation, especially applicable wherever quantitative relationships are of no particular interest, the heterokaryon was grown for the desired period in liquid stand-culture, then thoroughly macerated, and thinly streaked upon the surface of a semisolid medium in Petri-dishes. This procedure yielded, following incubation, a random mixture of small, separate mycelia of heterokaryon(s), the component homokaryons, and het-mutants present at the time of maceration. The het-mutants, usually distinguishable by the time the mycelia were macroscopically visible, could then be picked off, free, from the first, of contaminating mycelial types.

Isolations of hyphal tips from viable hyphal fragments in small, random samples have been made in a few cases. A suspension of hyphal fragments, prepared by thorough maceration and gentle centrifugation, was uniformly suspended in agar medium cooled to 40–50° C. Following solidification and a short period of incubation, the tip of the first hypha produced by each fragment was removed with a small, flattened needle.

The estimation of the frequency of expressed het-mutants is crude and altogether unsatisfactory. It provides, however, a preliminary basis for the determination of the comparative

effects of various factors upon the expression of het-mutants in the heterokaryon under varied conditions. In a two-week-old mycelium of a typical heterokaryon, [$A^1B^1(A^1B^2)$], growing in 20 ml of medium, the following determinations were made: average cell length of $97 \pm 9.5 \mu$ (coefficient of variation, $V = 70\%$) and an average of 130 hyphae traversing the field of a Zeiss 10 mm. objective (field diameter, 460μ) to a depth of 200μ . Since the average length of hyphal segments lying at random within the circular field is the mean chord length of 1.75 (360μ), the total cells per plate may be calculated from the above values as follows:

$$\frac{130 \times 360 \times 20,000}{97 \times [3.1416 (0.23)^2 \times 0.2]} = 2.9 \times 10^8.$$

It has previously been established a) that most cells of the common-*A* heterokaryon are uninucleate (PAPAZIAN 1950; RAPER and SAN ANTONIO 1954) and b) that heterokaryons grown in complete medium under standard conditions differ only slightly in mycelial mass (RAPER and SAN ANTONIO, 1954; P. G. MILES, unpublished). The value 3×10^8 may accordingly be used within tolerable limits of accuracy and variation to define the nuclear population of any common-*A* heterokaryon grown in standard plate culture. On the basis of relative mycelial mass, no mycelial type (homokaryon or dikaryon) should differ from this by more than a factor of three in either direction, so that the nuclear populations of *Schizophyllum* mycelia in general should lie in the range 10^8 — 10^9 .

An approximation of the frequency of expressed het-mutants was given by the number of evident mutants per plate divided by the total number of nuclei. The number of expressed het-mutants was determined by direct counts of the aberrant mycelia, discernible with a dissecting microscope, in heterokaryotic cultures.

Numerous biochemical and morphological mutants have been isolated from homokaryotic mycelia following irradiation with ultraviolet light. Finely macerated mycelium was thinly streaked upon the surface of semisolid medium and was irradiated at a distance of 20 cm. from an 18 watt, G. E. Germicidal lamp for a total dosage of 2000—2500 ergs/mm². Following incubation for 2—3 days, a small portion of the hyphal fragments resumed growth, and single hyphal tips were isolated and transferred to complete medium. Screening for and identification of biochemically deficient mutants followed the techniques described by BEADLE (1947) and PONTECORVO (1953).

C. Experimental results

The experimental studies were designed to provide information on 1. the relationship between heterokaryosis and het-mutant expression, 2. the role of external and intrinsic factors on the relative abundance and specific types of het-mutants expressed, 3. the mutants appearing in heterokaryons as compared to those induced by a physical mutagenic agent, and 4. the origin, selection, and mobility of het-mutant nuclei in the heterokaryon.

Gross aspects of mutant expression

The gross aspects of the appearance of het-mutants in heterokaryons have been briefly described in previous papers by PAPAZIAN (1950) and RAPER (1953). Numerous significant details of the process, however, have been brought to light since the publication of the former and were omitted from the brief account in the latter.

Although there is considerable morphological variability among common-*A* heterokaryons of *S. commune*, the majority grow on standard complete medium as sparse, depressed mycelia having few, if any, aerial elements. The rate of linear growth is about the same as that of homo- and dikaryotic mycelia and is such as to cover, from a single, central inoculum, an entire 9 cm. dish in 7—9 days. Small, densely branched, and radially organized clumps of hyphae appear in the older portions of such cultures rarely as early as 5 days and commonly as early

as 7 days after inoculation. These hyphal clumps, which have the appearance of contaminating molds because of their total dissimilarity to any of the normal mycelial types of *S. commune*, increase in number and, to some extent, in size with the aging of the heterokaryon. These atypical growths never appear in the peripheral, growing fringe, but only in the older portions of the mycelium; as growth proceeds they originate at points progressively farther from the point of inoculum, so that in aged cultures they are uniformly distributed throughout the heterokaryotic mycelium.

In final size and morphology, the atypical growths display a wide range of variability. Certain of them continue to grow and produce loose, sprawling mycelia which, in rare cases, may ramify throughout the larger portion of the original culture. The other extreme is represented by the majority, which appear to stop growing after the initial, dense clumps are formed; these range in size up to 1—2 mm. in diameter.

The hyphal clumps originate through renewed growth of occasional viable cells scattered among the dead and autolysing elements of the aging heterokaryon. Most of these cells, which are highly refractile and easily distinguished from the moribund elements of the mycelium, subsequently die off, but rarely one will renew growth and by profuse branching develop into a compact mycelial clump. More than a thousand of these mycelial forms have been isolated and characterized. Although the detailed description of the morphological, physiological, and genetic features of these isolates will be the subject of a forthcoming paper, their brief characterization is essential for the present account.

1. Each is homokaryotic. They are derived, as indicated by the incompatibility factors which serve as markers, from the component nuclei of the heterokaryon and are expressed in approximately the ratio of predominant to secondary nuclear components.

2. Each exhibits a specific morphological aberration of which there are several types varying from nearly normal to extremely aberrant. Eight types have been repeatedly encountered, and each has been named according to its outstanding morphological feature: *Streak*, *thin*, *fir*, *feather*, *dwarf*, *bubble*, *puff*, and *blue*.

3. Each type, with the exception of *dwarf*, differs from wild-type by a single mutated locus, which appears to be both characteristic and specific for each morphological type (RAPER and MILES, in press). Furthermore, each mutant allele is recessive to its wild-type counterpart in the balanced dikaryon. These *heterokaryotic* or *het-mutants* generally mate unilaterally—each provides di- or heterokaryotizing nuclei for any normal mycelium having the appropriate incompatibility factors but does not itself become dikaryotized or heterokaryotized.

There is no necessary correlation between the morphology of the original mycelial clump formed in the heterokaryon and the specific type of het-mutant to which it can be assigned following isolation. A total of 38 het-mutants were isolated from the central region of the heterokaryon [$A^2B^x(A^2B^1)$]* as indicated in Fig. 1. These, following isolation, were shown to belong to four distinct het-mutant types and are identified in Fig. 1 as follows: s-*streak*, t-*thin*, fl-*fluff* (a variant of *thin*), f-*fir*, fb-*big fir* (possibly a suppressor mutation form of *fir*),

* The superscript "x" indicates a "mutant" (KNIEP 1923) or recombined incompatibility factor (PAPAZIAN 1951, RAPER 1953).

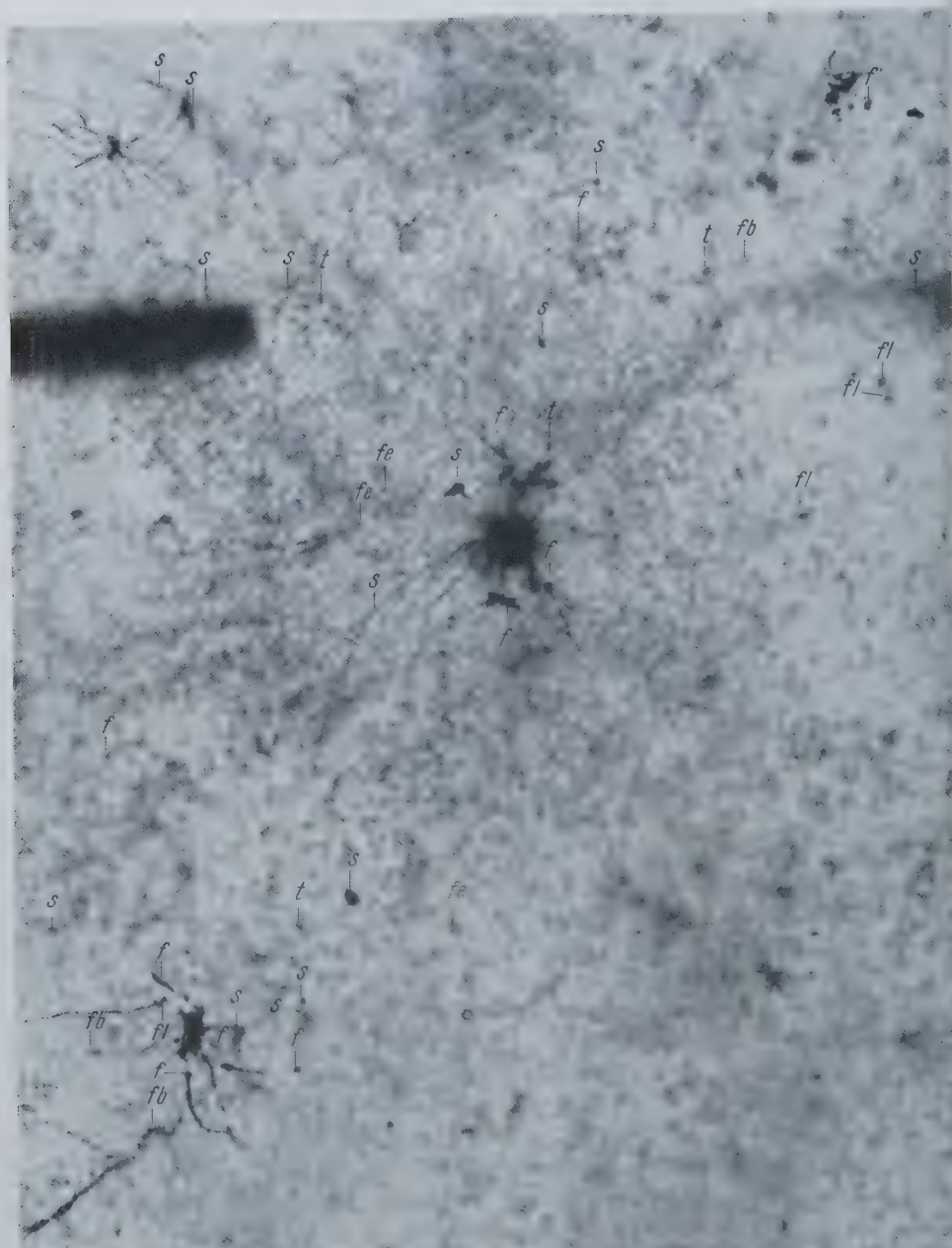


Fig. 1. The central area of a Petri-dish-culture of the common-*A* heterokaryon, $[A^2B^2(A^2B^1)]$, of *S. commune*. Isolations from the designated locations yielded mutants of the several types as follows: *s*-streak, *t*-thin, *fl*-fluff (a variant of *thin*), *f*-fir, *fb*-big fir (probably a suppressor-mutation form of *fir*), and *fe*-feather. $\times 6$

and *fe*-feather. *Streak* and *thin*, two types which in isolated culture produce diffuse, indeterminate mycelia, were recovered both from large, spreading and

from small, dense original clumps. Conversely, *fir*, which in isolated culture produces a small, dense mycelium rarely exceeding 1 cm. in diameter, was also isolated from both types of original clumps. The failure of the het-mutants to assume distinctive morphologies *in situ* imposed the necessity of isolating large numbers of mutants in certain of the experimental studies described below.

In the experiments and considerations that follow, an important and necessary distinction must be made between the total existing mutated nuclei in a homokaryon or heterokaryon and the mutations that have come to visible expression in such a culture. In order to avoid any confusion on this central point, the latter will be termed *expressed het-mutants*. Only in a few cases which are specifically indicated below have any serious attempts been made to determine the relative abundance of mutated nuclei because of the difficulty of quantification of such results.

The incidence of expressed het-mutants

The frequency of expressed het-mutants varies within extremely wide limits in heterokaryons constituted of genetically different strains. A few specifically constituted heterokaryons that contained no evident mutants have been examined, frequently in replicated series of 10 or more plates. The lower limit of het-mutant expression in such heterokaryons must accordingly lie somewhat below 10^{-9} . At the other extreme, averages of 1440 and 8200 mutants per plate, respectively, were observed in two specific heterokaryons, $[A^2B^1(A^2B^2)]$ and $[A^2B^r(A^2B^1)]^*$. The frequencies of expressed mutations in these cases were 5×10^{-6} and 2.9×10^{-5} .

The over-all nuclear composition of typical common-*A* heterokaryons is extremely fluid, and mutant nuclei may constitute a majority of the viable nuclei well before the end of the period of expression of new mutant mycelia. Total isolation samples of macerates of the heterokaryotic product of the mating $A^1B^1 \times A^1B^2$ revealed no het-mutants at 6 days in either of the reciprocally constituted heterokaryons. At 21 days, however, 32.7% of the isolates from one heterokaryon and 79% of the isolates from the other were mutant (Table 1). The frequencies in the same two heterokaryons of expressed het-mutants were 1.8×10^{-7} and 6×10^{-8} , respectively. The high proportion of mutant nuclei in the heterokaryons probably results from both the active propagation of mutant nuclei and their greater survival capacity under adverse conditions such as starvation—an effect that has been shown in a number of other fungal species (FRIES 1948, PONTECORVO 1953).

Mutants of the specific types commonly found in heterokaryons are infrequently seen in homokaryons. A meaningful background frequency for their expression in homokaryons, however, is difficult to determine. Throughout the period 1951–1954, during which most of the experiments described here were performed, a combined sample of 3000–4000 cultures of homokaryotic strains involved in these studies were examined and yielded no more than 10 expressed het-mutants. The incidence of expression in this control sample was accordingly of the order of 10^{-12} .

A number of observations, however, cast grave doubt on the validity of this extremely low value.

* This heterokaryon contains different strains and is distinct from that similarly designated above and shown in Fig. 1.

Table 1. Nuclear composition and frequency of mutant nuclei in reciprocally constituted heterokaryons

Original Mating	$(A^1B^1:A^1B^2)$			
	$[A^1B^1(A^1B^2)]$		$[A^1B^2(A^1B^1)]$	
Specific Heterokaryons				
Nuclear Components.	Predominant	Secondary	Predominant	Secondary
Strain	A^1B^1	A^1B^2	A^1B^2	A^1B^1

At 6 days:					
No. Isolates	142		2	141	3
Nuclear Ratio		71:1			47:1
No. Mutants	0		0	0	0
Percentage Mutants	0		0	0	0

At 21 days:					
No. Isolates	196		0	116	83
Nuclear Ratio		196:1			1.4:1
No. Mutants	64		—	77	80
Percentage Mutants	32.7		—	66.4	96.5

Expressed mutants at 6 weeks:		
Plates counted	26	27
Average Mutants per plate	51 ± 6.1	18.1 ± 1.05
Frequency	1.8×10^{-7}	6×10^{-8}

1. Since 1954, het-mutants, predominantly *thin*, have appeared in certain of these same homokaryons with increasing frequency—often to the extent that we have been unable to maintain the wild strain in stock. It is not known whether the preponderance of *thin* reflects a higher spontaneous mutation rate for it than for other mutations or solely the fact that of all the mutants known in *S. commune* it alone has a higher rate of linear growth than the wild type.

2. ROSHAL (1953), working in our laboratory, isolated various het-mutants from homokaryotic cultures maintained for more than a year at 3–5° C and from cultures (including certain strains used in the present studies) periodically renewed by massive mycelial transfers. A later effort to confirm the latter effect both at 24° C and at 34° C, gave negative results.

3. Homokaryons, isolated as direct progeny of many stocks collected from nature since 1954, vary tremendously in their apparent genetic stability. Monosporous progeny of certain stocks remain uniformly wild type in continued culture, whereas a high percentage of the progeny of other stocks show occasional mutant sectors even when first isolated.

In none of these cases does the incidence of expressed het-mutants closely approach that regularly observed in typical heterokaryons, but the maximal observed frequency does compare roughly to the minimal frequency given above for heterokaryons.

Factors affecting mutation expression

The expression of het-mutants in the heterokaryon can be affected to an appreciable extent both by the alteration of external conditions and by the manipulation of certain internal factors.

1. *External factors.* A number of external factors, including temperature, light, hydrogen-ion concentration, and composition of the medium have been tested

to determine their effects upon the expression of het-mutants in the heterokaryon. Of these four factors, only temperature had any appreciable effect.

In replicate series of 52 plate cultures of the heterokaryon [$A^1B^2(A^1B^1)$], grown at temperatures of 15.5°, 24°, and 34° C, determinations of mycelial growth and the number of het-mutants expressed were made at intervals for 25 days. Growth was rapid at 24° and 34° C and differed only by about a day's lag at the lower temperature, while a considerably reduced growth rate obtained at 15.5° C. The rate of expression of het-mutants was roughly the same at 24° and 34° C with the lag increased by 4–5 days at the lower temperature, and the rate of expression was strikingly lower at 15.5° C (Fig. 2).

2. *Internal factors.* Certain inherent factors appear to be far more important in the determination of the abundance and kinds of expressed het-mutants than are the external factors that have so far been tested. The more important of these are the age and the genetic constitution of the heterokaryon. The effect of age can best be shown by a brief account of two experiments.

Three series of 50 ml flasks, each containing 10 ml of liquid medium, were inoculated with macerates of A^1B^1 , A^1B^2 , and A^1B^1 plus A^1B^2 , respectively; these were then incubated at 24° C for periods of 1, 2, 4, and 8 weeks. At each of these times a culture of A^1B^1 and a culture of A^1B^2 were combined and macerated, and a small sample (ca. 0.1 ml) of this macerate was uniformly streaked upon each of 20 plates of semisolid medium. A single culture of the heterokaryon ($A^1B^1:A^1B^2$) was similarly macerated and streaked out. Counts of expressed het-mutants were made at five days. The average terminal numbers of expressed het-mutants per plate in the two series were as follows:

Age of Liquid Culture	$A^1B^1 \times A^1B^2$ (Grown separately)	$A^1B^1:A^1B^2$ (Grown together)
1 week	8.9	4.5
2 weeks	7.3	5.9
4 weeks	11.7	75.5
8 weeks	15.7	380.0

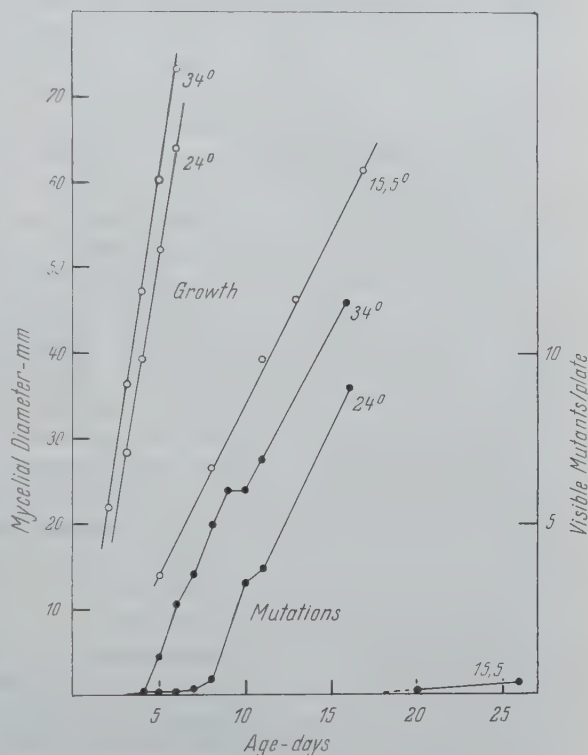


Fig. 2. The effect of temperature upon mycelial growth and the expression of evident het-mutants in the heterokaryon, [$A^1B^2(A^1B^1)$], of *S. commune*

The total number of colonies was appreciably lower in the 4- and 8-week samples.

These results clearly indicate a marked increase in mutant cells with increased age of the heterokaryon, but no quantitative expression can be given to this increase since no realistic correction could be applied for cellular multiplication of individual het-mutant mycelia prior to maceration. Several points of interest, however, were implicit in observations incidental to this experiment. Of significance are the following: 1. No het-mutants appeared in the plates inoculated with the separately grown homokaryons as the direct growth of the dispersed inoculum; they appeared only following the establishment of the heterokaryon. If het-mutants were present in the homokaryons, they either were too few to be revealed by this method or were inhibited in their development to visible mycelia. 2. Only normal homokaryons and heterokaryons developed directly from the inocula of the heterokaryons plated out at one and two weeks, but het-mutants appeared simultaneously with homo- and heterokaryotic mycelia in the plates from the 4-week and 8-week heterokaryons. 3. The plates from the heterokaryon at eight weeks revealed a strong preponderance of het-mutant mycelia; normal mycelial types, either homo- or heterokaryotic, were but rarely seen. Most of the viable nuclei in the heterokaryon at eight weeks were therefore mutant.

In the characterization of 353 het-mutant isolations taken from the test plates following the final counts, two further points were evident: 4. A far greater variety of het-mutant types was involved than had been previously suspected. PAPAZIAN (1950) had described two, *streak* and *dwarf*; no less than six specific types were recovered among these isolates. 5. There were strong indications of a correlation between the morphological types of the het-mutants and the age of the heterokaryon from which they were derived.

To test this suspected correlation in a more adequate manner, a second experiment was performed. Homokaryons A^1B^1 and A^1B^2 were grown separately in liquid medium for a few days, macerated together, and streaked out uniformly and heavily upon a series of plates. The resulting heterokaryons were examined at frequent intervals during a period of six weeks, and at each examination newly visible het-mutants were located by marks on the backs of the culture dishes and identified in respect to time of appearance. At the end of six weeks, 200 isolations were made of the mutants appearing at various times. From these isolations, 168 het-mutants were recovered in pure culture. When these were tabulated in respect to morphological types and the time of appearance, there was apparent a definite shift toward the expression of the more severely aberrant types as the heterokaryon aged. Well over half of the het-mutants that appeared during the first two weeks were of the fast-growing type, *streak*, whereas after three weeks, slow-growing types, *fir*, *feather*, *dwarf*, and *bubble* were predominant; a third category comprising *thin* remained constant after two weeks (Table 2). In the absence of definitive information about the origin and early history of the mutants of the various types, the meaning of this correlation between heterokaryotic age and mutant type is unclear.

Comparison of het-mutant expression in a wide variety of differently constituted heterokaryons has implicated genetic factors as the most critical determinants of the number and types of mutations expressed. These studies have

involved a large number of heterokaryons of three different natural stocks, $A^1A^2B^1B^2$ (Chicago, Ill.), $A^7A^8B^7B^8$ (Lake Geneva, Wis.), and $A^9A^{10}B^9B^{10}$ (Big Sur, Calif.), and of three backcrossed stocks, $A^1A^2B^1B^2$, $A^1A^4B^1B^4$, and $A^1A^6B^1B^6$.

An examination of heterokaryons of three natural stocks was undertaken to extend the preliminary survey of PAPAŽIAN (1950) to test the prevalence of heterokaryosis and expression of het-mutants in *S. commune*. The results confirmed his previous findings. Our study, however, revealed an additional fact of interest in the present consideration: heterokaryons of each individual stock yielded het-mutants that were more or less distinct from those of other stocks.

This stock-specificity can best be described in respect to three points of differentiation: 1. the specific types of het-mutants that appeared, 2. the relative abundance of the several types, and 3. the morphology of corresponding types. Two observations will serve to illustrate these points.

1. The most frequently encountered het-mutant type in

Table 2. Age of heterokaryon vs. het-mutant types expressed

Age-days	Het-mutant types						Total
	<i>streak</i>		<i>thin</i>		<i>fir, feather dwarf, bubble</i>		
	No.	%	No.	%	No.	%	
0—14	27	63	0	0	16	37	43
15—21	19	43	9	20	16	37	44
22—34	4	11	9	26	22	63	35
35—41	2	4.3	8	17.5	36	78.3	46
							168

heterokaryons of the $A^9A^{10}B^9B^{10}$ stock regularly produces indigo (MILES, LUND, and RAPER 1956). The same pigment is also produced by certain isolates of *streak* of the $A^1A^2B^1B^2$ stock (PAPAŽIAN 1951). The mutations in the two cases, however, involve distinct loci and their effects differ in detail (RAPER and MILES, in press). 2. A number of het-mutant types, such as *streak*, *fir*, and *feather*, were found in heterokaryons of all three natural stocks, the gross characteristics in each case being sufficiently clear to identify them unambiguously. Within any one type, however, minor features, such as appearance of mycelial surface, extent of growth, branching habit, etc., differed appreciably.

A number of attempts have been made to breed strains for high het-mutant expression and to determine a segregative pattern of such expression in the $A^1A^2B^1B^2$ stock. Crosses were made in the two compatible combinations between the original Papazian strains of the $A^1A^2B^1B^2$ stock: $A^1B^1 \times A^2B^2$ and $A^1B^2 \times A^2B^1$. From each of the resulting fruits a number of monosporous mycelia (strains) were isolated, and their mating types were determined. Duplicate matings were then made between the progeny of each cross in all possible common-*A* combinations, and the resulting heterokaryons were examined for expressed het-mutants after incubation for four weeks. A total of 35 homokaryons and 67 heterokaryons were involved in this comparison. The heterokaryons may be considered as belonging to four groups, each group defined by common parentage and common *A* factor.

There was tremendous variability of het-mutant expression in different heterokaryons, but this variability could not be correlated either with parental origin or with specific incompatibility factor combination. The average number of expressed het-mutants per plate in the heterokaryons of the four groups was 3.5, 10, 15, and 175, respectively, but there was wide variation within each group (Table 3). The high average of 175 for the exceptional group resulted from high

incidence in a single mating, each plate of which had more than a thousand expressed het-mutants.

In general, the counts of expressed het-mutants of the two plates of each specific mating were only in fair agreement, but there was no single case in which both plates of a set were devoid of expressed het-mutants. In view of the discrepancies between the two members of many sets, a test was made to determine the validity of the rather striking differences between certain sets. The two heterokaryons of the ($A^1B^2 \times A^2B^1$) cross showing the highest and the lowest number of expressed het-mutants, 18 and 56 in the two plates in the one case and 1 and 0 in the other, were each reconstituted in a replicate set of 20 plates. At four weeks there were 22.7 ± 1.4 ($V=24\%$) expressed het-mutants per plate in the "high producer" and 3.15 ± 0.55 ($V=72\%$) in the "low producer". Although there was wide variation in each set, these results substantiate the significantly different number of mutants appearing in differently constituted heterokaryons.

A detailed analysis of the data from which the summary in Table 3 was drawn, revealed a substantial variation in the several strains from both parental crosses in respect to the number of het-mutants expressed in heterokaryons of which they were components. The average number of expressed het-mutants per plate of all heterokaryons ranged, for the 34 tested strains, from 2.0 to 360. These striking differences, however, reflected chiefly the high number of expressed het-mutants in a few specific combinations of strains rather than consistently high numbers in all of the heterokaryons involving individual strains. For example, two strains of the ($A^1B^1 \times A^2B^2$) series showed averages of 370 and 350 expressed het-mutants per plate; yet, if the particular heterokaryon resulting from their mating with each other is discounted, their averages were only 4.3 and 10.

One further attempt was made to determine if the number of het-mutants expressed in heterokaryons could be correlated with a simple segregation pattern among their component strains. Component strains, of mating types A^1B^1 and A^2B^2 from the ($A^1B^2 \times A^2B^1$) cross, of heterokaryons having the highest and the lowest number of expressed het-mutants were selected and mated in the following combinations:

A^1B^1		A^2B^2
High	$\times$	High
High	$\times$	Low
Low	$\times$	Low

A number of progeny was isolated from the fruits of each cross, and common- A matings were made and evaluated as before. If one single combination of the *low* $\times$ *low* series be disregarded—of this one exception, more later—the three series were indistinguishable. Each set exhibited essentially the same pattern and range of variability that had been encountered in the preceding matings (Table 3).

The exceptional mating, ($A^2B^2:A^2B^1$), was of particular interest in two respects: far more expressed het-mutants appeared in it than in any heterokaryon previously observed and, in the original mating, practically all of the het-mutants appeared in that portion of the heterokaryon clearly derived from only one of the two mated strains. It therefore appeared to be an ideal combination with which to test the relative expression of het-mutants in paired, reciprocally constituted heterokaryons. A parallel test was also made with the paired hetero-

karyons of the combination most intensively studied to date, ($A^1B^1:A^1B^2$). In each case the two appropriate homokaryons were mated and allowed to incubate until the heterokaryons were well established. Small inocula of each of the specific heterokaryons were then transferred to a series of 25 plates. These plates

Table 3. *Expressed mutations in two lines of the $A^1A^2B^1B^2$ stock*

Parental Cross	$(A^1B^1 \times A^2B^2)$				$(A^1B^2 \times A^2B^1)$			
Segregants	A^1B^1	A^1B^2	A^2B^1	A^2B^2	A^1B^1	A^1B^2	A^2B^1	A^2B^2
No. of Strains	5	5	4	4	9	2	2	4
No. of Common- <i>A</i> Heterokaryons	25		16		18		8	
Average Mutants per plate . . .	15		175		10		3.5	
Range, Mutants per plate . . .	0-54		0-1400		0-56		0-11	

were incubated for a week at 24° C, sealed, and incubated for an additional four weeks, at the end of which time counts of expressed het-mutants were made. The results were as follows:

Original mating	$(A^1B^1 : A^1B^2)$		$(A^2B^1 : A^2B^2)$	
Specific heterokaryon	$[A^1B^1(A^1B^2)]$	$[A^1B^2(A^1B^1)]$	$[A^2B^1(A^2B^2)]$	$[A^2B^2(A^2B^1)]$
Expressed het-mutants/plate	51.0 ± 6.1	18.1 ± 1.05	19.1 ± 4.9	8200 ± 810

It is thus apparent that not only the specific combination of strains is of critical importance in determining the number of het-mutants expressed, but that the specific role of each of the two strains (predominant or secondary) in the association is at least equally important.

A total of several hundred het-mutants have been isolated and characterized in these studies and in that to follow, and it became increasingly apparent that the "spectrum" of the het-mutants expressed was, in each case, heterokaryon-specific. For example, from the pair of heterokaryons of the mating ($A^1B^1:A^1B^2$), seven different mutant types, all except *blue*, have been recovered from $[A^1B^1(A^1B^2)]$, whereas only four types, *streak*, *thin*, *fir* and *feather*, have been isolated from the reciprocal heterokaryon, $[A^1B^2(A^1B^1)]$. Although no isolations were made, a more striking dissimilarity was evident in the two members of the heterokaryotic pair ($A^2B^1:A^2B^2$). The expressed het-mutants in one heterokaryon, $[A^2B^1(A^2B^2)]$, were of a wide variety of types, while all of the expressed het-mutants of the other $[A^2B^2(A^2B^1)]$, appeared to be of the same type and differed only in size. The exact data needed to validate this correlation were not accumulated during the study.

The effects of the uniformity of the genetic background on the number of het-mutants expressed have been subjected to preliminary test in three stocks. Strains of mating types A^2B^2 , A^4B^4 and A^6B^6 were crossed with A^1B^1 to establish stocks $A^1A^2B^1B^2$, $A^1A^4B^1B^4$, and $A^1A^6B^1B^6$. Repeated backcrosses were then made for a number of generations by mating progeny of each of these three stocks (A^2B^2 , A^4B^4 , and A^6B^6) with A^1B^1 . A total of 39 common-*A* matings, each in duplicate, was made between the fourth generation progeny of $A^1A^2B^1B^2$, the sixth generation progeny of $A^1A^4B^1B^4$, and the original A^1B^1 strain. Het-mutants were

evident in only a very few cases: a total of 10 expressed het-mutants, or an average of 0.13 per plate, were observed in the 78 heterokaryons of this series. One plate had two het-mutants; 88% of the plates were accordingly devoid of expressed het-mutants. Nine common-*A* matings between certain of the backcrossed strains and original isolates of the "native" $A^1A^2B^1B^2$ stock served as controls. In the control heterokaryons, the number of expressed het-mutants varied within the expected range, 10—50 per plate. The sixth generation progeny of the backcrossed $A^1A^6B^1B^6$ stock behaved quite differently. In this stock, 45 heterokaryons were compared with appropriate controls; the number of expressed het-mutants in the two groups of heterokaryons was indistinguishable. In this case, both the backcrossed and control groups displayed the usual range of variation, both in respect to number and types of het-mutants.

These various attempts to establish the genetic basis of the expression of het-mutants in common-*A* heterokaryons have fallen far short of expectations; certain provisional conclusions may nevertheless be drawn from the summed results. 1. The genetic bases for heterokaryosis and the expression of het-mutants therein are distinct. Heterokaryosis, with only negligible variation, has been encountered in every mating between strains carrying common incompatibility factors at the *A* "locus". Heterokaryosis of this particular type must therefore be considered the result of an interaction of the compatibility mechanism *per se*. Heterokaryosis appears as a highly favorable or necessary condition for the expression of het-mutants, but the expression of het-mutants does not always result, as does heterokaryosis, from a "double dose" of the *A* incompatibility factor. 2. A high degree of heterozygosity between the component strains of the heterokaryon is not necessary for the average expression of het-mutants. 3. The qualitative and quantitative expression of het-mutants in the heterokaryon appears to be determined by a number of genetic factors which in certain combinations superpose the phenomenon of high mutant expression upon heterokaryosis.

An adequate test of each of these postulates will be attempted as time permits.

Comparison of het-mutants with mutants induced by ultraviolet light

Close to a hundred aberrant mycelia have been recovered by total isolation from homokaryotic mycelia irradiated with ultraviolet light. These mutants fall into two large categories: biochemically deficient and morphologically aberrant mutants. Certain points of comparison between the mutants isolated from heterokaryons and those induced by UV deserve emphasis in the present account.

The "spectra" of mutants recovered under the two circumstances are essentially, though not totally, distinct. The mutants induced by UV encompass a far wider range of variability than do the isolated het-mutants; among 45 UV induced morphological mutants that have been retained and characterized there are no few common types to which all can be assigned, and the range of aberrancy appears to be more or less continuous. The same sort of random distribution obtains among the biochemical mutants: these include strains deficient for most of the members of the vitamin-B complex, for a number of amino acids, and for various purines, but exact duplication of mutant characteristics has rarely

occurred in our sample. In heterokaryons, by contrast, only a limited number of mutant types has been found, and each of these has been repeatedly recovered.

Two het-mutant types, *streak* (2 isolations) and *puff* (1 isolation), have been recovered from irradiated homokaryons along with many aberrant mycelia of non-het-mutant types. Overlap in the opposite direction has been sought. Numerous morphologically wild isolates from heterokaryons in which large numbers of het-mutants appeared and many het-mutants have been tested for biochemical deficiencies: all except one grew upon minimal medium. The exception, a *dwarf* het-mutant, was found, three years after its isolation, to require either hypoxanthine or guanine for growth. The origin of this deficiency, however, could not be established after so long an interval in culture. The total number of isolates taken from heterokaryons and tested for biochemical deficiencies, however, was of the order of a few hundred, and deficient nuclei present in the mycelium at the frequency of expressed het-mutants (10^{-5} or less) would not have been detected.

The possible mutagenic capacity of filtrates

A number of experiments have been performed during the past three years to test the effects of filtrates of aged heterokaryons upon the incidence of evident het-mutants in normal homokaryons. Early in the series, the results were positive and significant: het-mutants of several types appeared in large numbers in wild homokaryons grown for ten days or longer in the cell-free filtrates of aged heterokaryons. Certain refinements that in retrospect were of questionable value were introduced in later attempts to confirm and extend these findings; they have given ambiguous results.

The failure to obtain predictable results here may lie either in some inadequacy of experimentation, which requires prolonged and involved procedures at best, or in some yet unsuspected characteristic of the common-*A* heterokaryon, an extremely complex association which is at present but imperfectly understood. Work both on the possible mutagenic activity of filtrates and on the characterization of the heterokaryon is being continued, particularly in the development of more direct methods.

Origin, selection, and mobility of mutant nuclei in the heterokaryon

During the past two years a number of experiments designed to clarify the underlying mechanics of heterokaryotic mutagenesis have been performed. These have dealt with the relative selection of het-mutants in homokaryons and in heterokaryons, the mobility of het-mutant nuclei within aging heterokaryons, and attempts to determine approximate mutation rates in homokaryons and in heterokaryons. Some definitive information has been achieved toward the first two objectives; only inconclusive results have been attained in respect to the third.

1. *Selection of het-mutants in homokaryons and heterokaryons.* A distinct selective advantage for the vegetative propagation of het-mutants in the heterokaryon as compared to the homokaryon has been demonstrated only for the het-mutant *thin*.

Three sets of plates of complete medium were set up and prepared as follows:

1. inoculated centrally with homokaryon A^1B^1 , 2. inoculated centrally with the

established heterokaryon [$A^1B^1(A^1B^2)$], and 3. left uninoculated. All three sets were then covered with circular sheets of dialysing Cellophane and incubated for two weeks. At this time replicate sets of 5 plates were centrally inoculated (upon the membrane) with a wild homokaryon, a heterokaryon, and each of the het-mutants listed below. The plates were reincubated for two additional weeks, and dry weight determinations were made of the mycelia growing upon the membranes.

The results in the three sets were as follows:

1. On the homokaryon, no growth in any case.
2. On the heterokaryon, growth only of *thin*, 4.72 mgm.
3. On the previously uninoculated plates, the average weights in mgm.: A^1B^1 wild, 14.05; [$A^1B^1(A^1B^2)$] heterokaryon, 7.67; A^1B^1 streak, 5.79, A^2B^2 puff, 5.69; A^1B^1 feather, 1.06; A^6B^6 fir, 8.91; A^1B^1 thin, 8.44; A^2B^1 bubble, 0.32; A^9B^{10} blue, 7.8; and A^1B^1 dwarf, 1.88.

These results, while failing to show a selective advantage of all het-mutants to come to expression in the heterokaryon as compared to the homokaryon, in no way contradict either the observed ability of het-mutants to grow in the heterokaryon or any of the conclusions drawn from such observations.

2. *Mobility of het-mutant nuclei in heterokaryons.* Numerous attempts previously made to introduce third nuclear types into established common-*A* heterokaryons have been uniformly unsuccessful (PAPAZIAN 1950; RAPER and SAN ANTONIO 1954). These various attempts involved several different combinations of het- and biochemical mutants and wild types as donors and/or recipients and in common-*A* and compatible combinations of incompatibility factors. Yet, quite unexpectedly, in a system using biochemically wild het-mutants that were of the same mating type as one of the components of the heterokaryons, entry of foreign nuclear types was achieved and their mobility within common-*A* heterokaryons was demonstrated.

Two specific heterokaryons constituted of *uracilless* components, [$A^2B^2u^-(A^2B^1u^-)$] and [$A^2B^1u^-(A^2B^2u^-)$], were centrally established upon plates of complete medium and incubated for periods of 5, 10, 15, and 20 days. At these times replicate sets of 5 plates of each heterokaryon were inoculated with four biochemically wild het-mutants, A^2B^1 streak, A^2B^1 puff, A^2B^1 feather, and A^2B^1 bubble, as follows: a) one agar block containing hyphae of each het-mutant was inverted adjacent to the original central inoculum, b) a macerate of all four het-mutants was spread in a narrow band around the central inoculum. Heterokaryons not inoculated with het-mutants served as controls. At 30 days of age the cultures *less central disks one inch in diameter* were macerated and dispersed in pour plates of minimal medium.

Introduced het-mutants were recovered from the peripheral regions of heterokaryons in 11 of the 16 combinations of two specific heterokaryons, four time intervals, and two methods of inoculation:

	[$A^2B^1u^-(A^2B^2u^-)$]		[$A^2B^2u^-(A^2B^1u^-)$]	
	Block	Macerate	Block	Macerate
5 days	—	+	—	+
10 days	+	+	+	+
15 days	+	+	+	+
20 days	—	—	—	+

No growth occurred in minimal medium from the control heterokaryons. In each case except the one indicated by the asterisk (*), only a single het-mutant type was recovered; in the exceptional case, three of the four introduced types were recovered.

In view of the numerous past failures to introduce third nuclear types into these heterokaryons, success in the present instance is puzzling. It is known, however, that the immediate local conditions of inoculation are extremely important for nuclear transfer even between homokaryons (SNIDER and RAPER, unpublished); in this particular case the conditions must unaccountably have been especially favorable.

These results—quite aside from the unexpected entry of the het-mutant nuclei into the heterokaryon—demonstrate two points of central importance; a) The introduced het-mutants correspond in mating type and in specific types of mutations to those originating in the heterokaryon, and the facile mobility of the foreign nuclei strongly indicate comparable behavior of any mutated component. b) A continuous migratory course of viable elements persists in the heterokaryon to a much more advanced age than could possibly have been predicted from previous extensive microscopic observations.

3. *Attempts to determine mutation frequencies in heterokaryons.* The multicellular, mycelial nature of the material used in these studies presents a number of difficult—or possibly insurmountable—obstacles to the determination of mutation frequencies in heterokaryons and in homokaryons. The continuing study of nuclear populations is not feasible, and random sampling from nuclear populations can only follow mechanical mutilation (maceration) with numerous consequent effects that are difficult to standardize and impossible to assess accurately.

To date a single experimental approach that might provide approximate frequencies has been explored, but as yet the methodology is insufficiently developed to provide trustworthy results. The procedure involves the establishment of a large number of micromycelia of heterokaryons and of their component homokaryons, incubation for suitable periods, maceration of the micromycelia and their incorporation into nutrient medium, and examination for het-mutants. Adjustment of the quantity of nutrient, hence number of cells, to the level required to recover het-mutants from some of the micromycelia should determine an approximate mutation frequency and should provide a basis for comparison of frequencies in mycelia of different types.

The method is unfortunately more difficult to handle than it might appear, and considerable refinement is necessary before any definitive results can be expected.

D. Discussion

The experimental findings reported here reveal heterokaryotic mutagenesis to be an extremely complex phenomenon. The regular expression of mutants of a few specific types appears to be a corollary or by-product of the antagonistic interaction of the two component strains of the common-*A* heterokaryon.

The essential nature of the process cannot as yet be defined. The various experimental approaches have been largely of an exploratory nature, designed to

afford a basic comparison of the phenomenon with the occurrence and expression of mutations in a wide variety of other cases. Much work obviously remains to be done, for the study to date has provided no conclusive evidence bearing on the one central problem—the origin of the het-mutants.

Mutants appear as discrete growths in heterokaryons in tremendously greater frequency than in homokaryons and dikaryons. Any attempt to rationalize this difference must recognize two events that may be quite distinct and that must precede the appearance of the mutant as a micro- or macroscopically visible growth: a) the mutative event itself followed by b) the propagation of the mutated nucleus and the growth of the resulting mutant mycelium.

In the latter phase there can be no doubt that selection plays a determining role, for the mutants regularly develop to visible expression and frequently grow to extensive size under conditions in which the viable elements of the heterokaryon and any sectorized homokaryotic elements present can no longer grow. The unilateral mating response characteristic of most of the het-mutants may play a critical part in the initial stages of their release and development by preventing the reincorporation of the newly mutated nuclei into heterokaryotic associations with adjacent cells containing wild nuclei.

The fact of critical selective advantage in the expression of het-mutants in the heterokaryon, however, does not resolve the problem: the prior and central uncertainty of the origin of the het-mutants remains. Three propositions must be considered: a) that the mutations arise solely by spontaneous mutation and that selection of a few specific types under highly preferential conditions in the heterokaryon accounts wholly for the observed effects, b) that the heterokaryon, i.e., the conditions or products specifically created by the heterokaryon, induces mutations at a few specific loci, and c) that the conditions prevailing in the heterokaryon result in an increased general mutation rate which is followed by selection of the few observed mutant types.

Of these propositions the first is *a priori* and historically the more to be expected, since it involves only processes and relationships that have long been established. By contrast, the directed, auto-induction of mutations has long been sought. Increased genic instability has been shown in a few cases to result from direct genetic control of mutation rate: the Dissociation-Activator (*Ds-Ac*) system (McCLINTOCK 1953) and the "mutator" gene, *Dt* (RHOADES 1941), in maize and the "high mutation rate" gene, *hi* (IVES 1950), in *Drosophila*. More comparable to the present problem, however, are the many cases of suspected automutagenic activity of metabolic products in aging seed of higher plants (D'AMATO and HOFFMANN-OSTENHOF 1956). No comparable effect has been demonstrated in microorganisms. The clear distinction between the selection of spontaneous mutations and the auto-induction of mutations in the present case is therefore highly desirable. A final and conclusive distinction, unfortunately, cannot be made from the data now available; nor can it be certainly expected from additional data resulting from experiments that can currently be designed. An intensive re-investigation of the heterokaryon is considered as prerequisite to any possible satisfactory solution of the problem if indeed it is soluble in the present case.

Summary

1. Genic mutations of a few specific types regularly come to visible expression in the hemi-compatible, common-*A* heterokaryons of *Schizophyllum commune*, a common tetrapolar mushroom. The phenomenon has been termed *heterokaryotic mutagenesis* and its mutant products, *het-mutants*.

2. The het-mutants appear in heterokaryotic mycelia as radially organized, atypical growths. In original morphology they range from large, sprawling mycelia to small, dense clumps.

3. The frequency of expressed het-mutants in heterokaryons varies between 10^{-9} and about 3×10^{-5} .

4. Temperature, alone of a number of external factors tested, has significant effect upon the expression of het-mutants.

5. There is a striking shift toward the more severely aberrant types of expressed het-mutants with increased age of the heterokaryon.

6. Comparison of het-mutant expression in heterokaryons representing a wide variety of genetic backgrounds (interstock, intrastock, and backcrossed) suggest a complex genetic basis for the phenomenon. High het-mutant expression can only be attributed to certain specific combinations of strains, never to individual strains. Furthermore, the particular balance between the two component strains is of critical importance, for het-mutant expression in paired, reciprocally constituted heterokaryons may differ tremendously.

7. The "spectra" of mutants recovered from heterokaryons and from homokaryons irradiated with ultraviolet light are all but completely distinct.

8. The origin of the het-mutants in the heterokaryon is not known. They may represent spontaneous mutations that are preferentially selected under the specific conditions created by the heterokaryon, or they may originate in an auto-mutagenic process. No final and conclusive distinction between the two alternatives can be made from the available data.

Acknowledgments. The authors wish to express their sincere appreciation to Mrs. SANDRA K. JACOBSON, for her conscientious and valuable assistance; to Drs. H. P. PAPAZIAN and J. Y. ROSHAL, for numerous strains of *S. commune*; and to those of their colleagues who have offered suggestions and counsel regarding the treatment and interpretation of the elusive phenomena met with in this study.

Literature

BEADLE, G. W.: Genes and the chemistry of the organism. *Sci. Progr.* **5**, 166—196 (1947). — D'AMATO, F., and O. HOFFMANN-OSTENHOF: Metabolism and spontaneous mutations in plants. *Advanc. Genet.* **8**, 1—28 (1956). — FRIES, N.: Viability and resistance of spontaneous mutations in *Ophiostoma* representing different degrees of heterotrophy. *Physiol. Plantarum* (Cph.) **1**, 330—341 (1948). — IVES, P. T.: The importance of mutation rate genes in evolution. *Evolution* **4**, 236—252 (1950). — KNIEP, H.: Über erbliche Änderungen von Geschlechtsfaktoren bei Pilzen. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **31**, 170—183 (1923). — McCLINTOCK, BARBARA: Introduction of instability at selected loci in maize. *Genetics* **38**, 579—599 (1953). — MILES, P. G., H. LUND and J. R. RAPER: The identification of indigo as a pigment produced by a mutant culture of *Schizophyllum commune*. *Arch. Biochem.* **62**, 1—5 (1956). — PAPAZIAN, H. P.: Physiology of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. *Bot. Gaz.* **112**, 143—163 (1950). — The incompatibility factors and a related gene

in *Schizophyllum commune*. Genetics **36**, 441—459 (1951). — PONTECORVO, G.: The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advanc. Genet. **5**, 141—238 (1953). — RAPER, J. R.: Tetrapolar sexuality. Quart. Rev. Biol. **28**, 233—259 (1953). — RAPER, J. R., and P. G. MILES: The genetics of *Schizophyllum commune*. (In Press.) — RAPER, J. R., and J. P. SAN ANTONIO: Heterokaryotic mutagenesis in the tetrapolar fungus, *Schizophyllum*. Rec. Genet. Soc. Amer. **21**, 60. Genetics **37**, 616 (1952). — Heterokaryotic mutagenesis in Hymenomycetes. I. Heterokaryosis in *Schizophyllum commune*. Amer. J. Bot. **41**, 69—86 (1954). — RHOADES, M. M.: The genetic control of mutability in maize. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **9**, 138—144 (1941). — ROSHAL, J. Y.: Studies of variation in dikaryotization of *Schizophyllum commune*, a tetrapolar Hymenomycete. Diss. Univ. Chicago 1953.

Prof. Dr. JOHN R. RAPER, Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass.,
 Dr. JAMES P. SAN ANTONIO, Plant Industry Station, U. S. D. A., Beltsville, Md., and
 Dr. PHILIP G. MILES, Department of Biology, University of Buffalo, Buffalo, New York

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

BASTARDIERUNGSVERSUCHE IN DER GATTUNG *STREPTOCARPUS LINDLEY*

VII. DIE GENISCHEN UND PLASMONISCHEN GRUNDLAGEN FÜR DIE POLLENSTERILITÄT VERSCHIEDENER *STREPTOCARPUS*-BASTARDE

Von

FRIEDRICH OEHLKERS und UTE EBELL

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Juni 1958)

A. Einleitung

In der theoretischen Auseinandersetzung des ersten der beiden Autoren über das „Problem der außerkaryotischen Vererbung“ (OEHLKERS 1952) war darauf hingewiesen worden, daß die Bastardsterilität im männlichen Geschlecht, die Ausbildung von Antheren also, die einen bestimmten Prozentsatz tauber Pollenkörner führen, dann, wenn sie reziprok gleich ist, kaum jemals als unter Mitwirkung des Plasmons geschehen interpretiert werden wird. Von solchen Bastarden in der Gattung *Streptocarpus*, bei denen bei beiden reziproken recht erhebliche Bastardsterilität im männlichen Geschlecht vorkommt, hatten wir seit längerer Zeit Kenntnis. Es sind das die Kreuzungen von *Str. solenanthus*, einer einjährigen unifoliaten Form, einerseits, mit verschiedenen Linien von *Str. Rexii* sowie *Str. cyaneus*, die beides rosulate Typen sind, andererseits. Da sich in der Gattung *Streptocarpus* trotz weitgehender Kreuzbarkeit der Arten untereinander dennoch erhebliche plasmonische Differenzen kennzeichnen, so erschien der Versuch, solche auch für den Erbgang der Pollensterilität herauszuarbeiten, zum mindesten aussichtsreich.

Eine zunächst etwas oberflächliche Prüfung der *solenanthus*-Bastarde mit den verschiedenen *Rexii*-Linien sowie *Str. cyaneus* zeigte mit Sicherheit, daß in beiden reziproken Bastarden Pollensterilität recht erheblichen Ausmaßes vorhanden ist. Doch schien sie anfänglich mehr oder weniger gleichmäßig zu sein. Bei genauerer Durchzählung indessen stellte sie sich bei den reziproken als um ein wenig quantitativ verschieden heraus. Wir haben also sogleich mit einer genauen statistischen Bearbeitung der F_1 begonnen, und ebenso in den Folgegenerationen beide reziproken behandelt, sowohl in einer nicht sehr umfänglichen F_2 , als auch in den zahlreicher durchgeführten Rückkreuzungsgenerationen, die bis zu der R_4 geführt worden sind. Aus den Resultaten können wir schließen, daß in der Gattung *Streptocarpus* ein weiteres Element genischer und plasmonischer Zusammenarbeit besteht, das über das Phänomen der Geschlechtsbestimmung hinaus bzw. unabhängig davon, dennoch den Ablauf der sexuellen Fortpflanzung eingreifend beeinflusst.

B. Material und Methode

Als Material wurde einmal *Str. solenanthus* verwendet. Diese Art ist von dem ersten der beiden Autoren (OEHLKERS 1941) für andere Zwecke wieder beschrieben und (OEHLKERS 1940 Tafel IV, Abb. 3) abgebildet worden. Dazu sei kurz bemerkt, daß wir sie seinerzeit

aus verschiedenen Botanischen Gärten mit unterschiedlichen Bezeichnungen erhalten haben. Die häufigste war *Str. tubiflos*. Ebenso wie alle anderen *Streptocarpus*-Arten wurden auch diese von Herrn Dr. MANSFELD bestimmt, und der hielt den Namen *Str. solenanthus* für zutreffend. Infolgedessen wurde die Art in



Abb. 1. *Streptocarpus solenanthus*

den früheren Schriften von OEHLKERS (1940, 1941) so bezeichnet. Die jetzige Form, mit der wir nunmehr gearbeitet haben, erhielten wir aufs neue von LAWRENCE, aber unter dem Namen *Str. Sandersii*. Wir lassen es dahingestellt sein, welche Bezeichnung die wirklich zutreffende ist und nehmen, allein der Kontinuität wegen, die von OEHLKERS früher benutzte, von MANSFELD als richtig befundene Bezeichnung wieder auf, weil sich die von LAWRENCE *Str. Sandersii* genannte Form in nichts von der anderen unterscheidet (vgl. Abb. 1), vor allen Dingen auch nicht in der reziprok nahezu gleichartigen Pollensterilität bei Kreuzungen mit verschiedenen Linien von *Str. Rexii*.

Mit *Str. solenanthus* wurde 1. *Str. cyaneus* (JIL)¹ gekreuzt, beschrieben und abgebildet bei OEHLKERS 1957, S. 3. Sodann *Str. Rexii* Basel (vgl. OEHLKERS 1957, S. 2), *Rexii type* (JIL), ferner *Rexii* weiß (JIL) (vgl. OEHLKERS 1957, S. 2). Zur Frage nach der Pollensterilität der Ausgangsformen ist zu sagen, daß alle zu den Kreuzungen verwendeten Formen fertil sind. Stichproben, die 1951 gezählt wurden, ergaben:

<i>Str. solenanthus</i>	2%	} steriler Pollen als Mittelwert von je 20 Blüten von 10 verschiedenen Pflanzen.
<i>Str. cyaneus</i>	7%	
<i>Str. Rexii</i> Basel	9%	
<i>Str. Rexii</i> albus	0%	
<i>Str. Rexii type</i>	8%	

Und diese Ergebnisse lassen sich immer wieder reproduzieren. Die Ausbildung guter Pollenkörner in reichlicher Zahl unterliegt keinen merklichen Schwankungen während der Vegetationsperiode. Für *Str. cyaneus* ist jedoch zu bemerken, daß Linien aus Selbstungen unter Inzuchtsschäden leiden, die sich in verminderter Blühwilligkeit, in der Ausbildung schlechter Pollenkörner, ja frühzeitigem Braunwerden der Antheren und in mangelhaftem Samenanatz äußern.

1949 wurden die Ausgangsformen, 1950 die F₁ aufgezogen, und von da an mehrfach Rückkreuzungen mit dem väterlichen Elter durchgeführt. Die Kreuzungen sind die folgenden:

Nr. 100 ²	1949; 1	<i>Str. (solenanthus × cyaneus)</i>
Nr. 101	1949; 2	<i>Str. (cyaneus × solenanthus)</i>
Nr. 102	1949; 4	<i>Str. (solenanthus × Rexii</i> Basel)
Nr. 103	1949; 3	<i>Str. (Rexii</i> Basel × <i>solenanthus)</i>
Nr. 104	1949; 10	<i>Str. (solenanthus × Rexii</i> albus)

¹ Es sei daran erinnert, daß JIL die Herkunftsbezeichnung ist und „JOHN INNES Horticultural Institution Abteilung LAWRENCE“ bedeutet.

² Die laufenden Nummern schließen sich ohne Rücksicht auf das Kreuzungs- oder Aufzuchtjahr an diejenigen der letzten Publikation an (vgl. OEHLKERS 1957, S. 15).

Nr. 105	1949; 9	<i>Str. (Rexii albus</i> $\times$ <i>solenanthus</i>)
Nr. 106	1949; 12	<i>Str. (solenanthus</i> $\times$ <i>Rexii type</i>)
Nr. 107	1949; 11	<i>Str. (Rexii type</i> $\times$ <i>solenanthus</i>)

Dabei wurde jedes Jahr von neuem das Merkmal der Pollensterilität ganz besonders eingehend und genau untersucht. Von einigen Pflanzen jeglicher Kombination wurden aus mehreren Blüten Pollen auf einen Objektträger ausgestreut und mit einem Tropfen Karminessigsäure befeuchtet. Unter jeweils 100 Pollenkörnern wurden die sich färbenden, also fertilen normalen Körner, den deformierten und weißbleibenden (sterilen) gegenübergestellt. Dabei zeigte sich in einzelnen Linien der Rückkreuzungsgenerationen, daß ähnlich wie in den Versuchen von MICHAELIS bei *Epilobium*, auch bei den *Streptocarpus*-Kreuzungen nicht 100% sterile Pollenkörner die stärkste Äußerung der Sterilität ist, sondern daß die Pollenkörner so frühzeitig absterben können, daß sie schließlich als kleiner klumpiger Haufen in den viel zu großen Pollenfächern liegen. 1953 fiel das in der R_3 Nr. 141 1952; 101/10 (*sol* $\times$ *cy*) $\times$ *cy* $\times$ *cy* $\times$ *cy* an 28 von 60 Pflanzen und in Nr. 143 1952; 111/24 (*sol* $\times$ *Ra*) $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* bei einzelnen Blüten von 23 der 60 untersuchten Pflanzen auf. 1954, in der R_4 , war es bedeutend stärker und häufiger:

Nr. 151, 1953; 70/42	(<i>sol</i> $\times$ <i>cy</i>) $\times$...	bei 46 von 60 Pflanzen
Nr. 152, 1953; 79/55	(<i>sol</i> $\times$ <i>RB</i>) $\times$...	bei 1 von 60 Pflanzen
Nr. 153, 1953; 78/12	(<i>sol</i> $\times$ <i>Ra</i>) $\times$...	bei 54 von 60 Pflanzen
Nr. 156, 1953; 76/39	(<i>sol</i> $\times$ <i>Rt</i>) $\times$...	bei 20 von 60 Pflanzen

und sogar in der sterilen Richtung aus der fertilen Linie Nr. 154, 1953; 77/44 bei 3 von 60 Pflanzen. Auffällig ist, daß der klumpige Pollen nur bei Kreuzungen im Plasmon von *Str. solenanthus* zu sterilen war.

Die Zahl der sterilen Körner wurde jeweils tabelliert. Um die Art und Weise unserer Tabellierung zu erläutern, sei eine einzige Tabelle von hundert abgedruckt (Tabelle I), freilich handelt es sich dabei um einen besonders komplizierten Fall, denjenigen nämlich, bei welchem die Pflanzen wiederholt durchgezählt und die Blüten auf die Infloreszenzen bezogen wurden. Im allgemeinen wurde einfacher tabelliert.

C. Experimentelle Ergebnisse

1. F_1 -Untersuchungen

Wir fassen im folgenden die F_1 -Untersuchungen zusammen, die wir im Jahre 1950 in geringem Umfang aufgezogen haben. Wir hatten damals nur Behelfsgewächshäuser, konnten uns also nicht allzusehr ausdehnen.

a) **Das Aussehen der Bastarde.** Die wichtigsten Merkmale der F_1 sind die folgenden. Die jeweils reziproken sind dabei zusammengefaßt. Nr. 100, *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) und Nr. 101, *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*) sind beide, wie zu erwarten, in ihrer Wuchsform rosulat. Die Blüten sind blaßblau mit violetter Tönung und gelbem Fleck im Schlund. Immerhin ist bemerkenswert, worauf noch an anderer Stelle einzugehen sein wird, daß hier durchaus feststellbare reziproke Unterschiede schon im vegetativen Habitus vorhanden sind. Die Bastarde mit dem *solenanthus*-Plasma sind in den Blättern etwas breiter, die Blüten sind größer und die Blütenzipfel haben eine runde Form gegenüber denen der reziproken. Die Blätter des Bastardes *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*) sind vielfach spitz zulaufend; wir werden später an anderer Stelle sehen, daß dann, wenn man eine sehr große F_1 aufzieht, erhebliche Deformationen der Blätter zutage kommen. Allgemein aber findet sich in allen Pflanzen mit *cyaneus*-Plasma eine Veränderung der Blüten, die ganz typisch ist (vgl. Abb. 2). Die Blüten sind schmaler, zwar nahezu ebenso lang wie die der reziproken, doch sind die Blütenzipfel spitz zulaufend, während sie bei der reziproken Form rund sind. — Die übrigen F_1 -Formen zeigen keine der eben angegebenen reziproken Verschiedenheiten, sondern allein eine geringe, aber feststellbare reziproke Verschiedenheit in der Pollensterilität. Davon wird in dieser Arbeit die Rede sein.

Die Bastarde Nr. 102, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* Basel) und 103, *Str. (Rexii* Basel $\times$ *solenanthus*) gleichen einander in ihrer rosulaten Wuchsform und in der Blattlänge von

Tabelle 1. *Sterilitätsverhältnisse einiger Einzelpflanzen, um die Art der Tabellierung zu*
Die Kursivzahlen wurden am 17. 9. bis 5. 10., und die fetten Zahlen am 21.—25. 8. aus-

	In- floreszenz	Blüte																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
5	I			100	100	100	100	100	100	100	87	99	30	29		77	78	22	51	94	100	60	14	17	7
	II	100	99	100	64	98	53	96	43	66	85	30	33	57	32	2	61	7	5						
	III	100	96	94	22	89	93	29	50		7	5	7	18	6	5	7								
	IV	90			12	5	15																		
9	I			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			90	29	26			43				
	II	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	52	85	50	59	17	33							
	III	100	100	100	100	100	100	100	100	100	54	69	13	37											
	IV	100	100	100	100		41	52	97	10	39	62													
13	I				18	2	11	62	7	11	8	72									40	37	52	14	10
	II						21	98	20												6	11	16	9	5
	III	22	62	37									10	9	10	13	14	11	5	15					
	IV																								
1	I	62	51	31	65	46	55				95	86	98	100	100	100				100	100	100	100	100	
	II	39	38					100	100	100	100														
	III			100	100	100	100					100	80		100	100	100								
	IV	100	96																						
2	I		12	5	15	16	9	17	4	12		88	14	12	8	6	6	27	16	5					19
	II	12	17	12	9	8		25	10	10	20	10	22	11	10	9									
	III	8	11		20	8									20	10	19	13	9		17	28	12		
	IV				4				14	5	21														
39	I							89	100	100		100	100	100	100										
	II	58	98	100	100			100	100	100	100														
	III	100		62	100	100	100	100																	
	IV	100																							
40	I	35	11	92			82	27	21	24	26														
	II	20	13		9	7	10	3																	
	III																								
	IV																								

Tabelle 2. *Anzahl der sterilen Pollenkörner in der F₁ unserer Kreuzungen (Mittelwerte in %)*

Die Anordnung ist so getroffen, daß die Kreuzungen, deren Bezeichnungen nur in Abkürzungen aufgeführt sind, nach Plasmagruppen zusammengestellt sind. Dabei machen die Kreuzungen mit *Str. solenanthus* als Mutter den Anfang.

Kreuzung und Zähltermine 1) 10.—14. 8 1950 2) 23. 10. 1950				Anzahl der sterilen Körner			
				von 10 Pflanzen	pro Kreuzung	pro Plasma- gruppe	pro Zähl- termin
Nr. 100	1949; 1	<i>sol</i> × <i>cy</i>	I II	692 699	1391 (69,6)	4061 (50,8)	I: 4469 (55,4)
Nr. 102	1949; 4	<i>sol</i> × <i>RB</i>	I II	533 546	1079 (54,0)		
Nr. 104	1949; 10	<i>sol</i> × <i>Ra</i>	I II	539 488	1027 (51,4)		
Nr. 106	1949; 12	<i>sol</i> × <i>Rt</i>	I II	318 246	564 (28,2)		
Nr. 101	1949; 2	<i>cy</i> × <i>sol</i>	I II	753 778	1531 (76,6)	4574 (57,2)	II: 4166 (52,1)
Nr. 103	1949; 3	<i>RB</i> × <i>sol</i>	I II	635 610	1245 (62,3)		
Nr. 105	1949; 9	<i>Ra</i> × <i>sol</i>	I II	602 524	1126 (56,3)		
Nr. 107	1949; 11	<i>Rt</i> × <i>sol</i>	I II	397 275	672 (33,6)		

demonstrieren. Zahl der sterilen Pollenkörner pro Blüte in % gezählt; die gewöhnlichen Zahlen wurden jeweils vorher ermittelt.

Blüte																					Nachkommenschaft	
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45		
0																					Nr. 150, 1952; 104 <i>Str. (Rt × sol)</i> × <i>sol × sol × sol</i>	
11	35 10		55	10	16	30	7															
3																					Nr. 174, 1953; 91/8 <i>Str. (Rt × sol)</i> × <i>sol × sol × sol × sol</i>	
	100																					
	15	32	21		10	16	20															
								100	99	100	98	100	84									

Tabelle 3. Statistische Daten über die Pollensterilität der F_1 (Varianzanalyse)

	Summe der Quadrate	Freiheits- grade (F G)	Varianz	Varianzen- quotient (Q)	P (nach MATHER)
Plasmagruppen	1644,8	1	1644,8	$t_{144} = 7,7$	0,001
Zähltermine	573,8	1	573,8	$t_{144} = 4,3$	0,001
Wechselwirkung					
Plasma/Zählungen	58,8	1	58,8	$t_{144} = 1,4$	< 0,1 > 0,05
Kreuzungen	36554,7	6	6092,5	297,1	< 0,001
Wechselwirkung					
Kreuzungen/Zählungen . .	928,4	6	154,7	5,6	< 0,05 > 0,01
Rest	3950,5	144	27,4	—	—
Summe	43711,0	159			
Kreuzung : Zähltermine . . .				$t_6 = 3,2$	< 0,02 > 0,01
Kreuzung : Wechselwirkung					
Kreuzung/Zählung				38,1	0,01

Alle anderen Beziehungen lassen sich statistisch nicht sichern.

30—40 cm. Es ist hier eine nicht unbeträchtliche Heterosis zu erkennen. Die durchschnittlich 5 cm langen Blüten sind blaßblau gefärbt und mit dunklen Schlundstreifen gezeichnet. Äußerlich sind diese beiden Bastarde nicht von dem Paar Nr. 106, *Str. (solananthus × Rexii type)* und Nr. 107, *Str. (Rexii type × solenanthus)* zu unterscheiden, und alles eben Gesagte gilt auch für diese. Die Bastarde Nr. 104, *Str. (solananthus × Rexii albus)* und Nr. 105, *Str. (Rexii albus × solenanthus)* sind ebenfalls reziprok gleich. Sie haben ungefähr 30 cm lange Blätter, weiße Blüten mit violetten Haaren, blaugestreiften Schlund und feine blauviolette Ecken in den Winkeln der Blütenzipfel. Ihre Wuchsform ist wie die aller anderen Bastarde rosulat.

b) Pollensterilität. Die Pollensterilität der F_1 ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Da sich dabei zwischen den Einzelpflanzen, ferner zu den verschiedenen Zählterminen, sodann zwischen den Kreuzungen und endlich auch zwischen den reziproken Bastarden, also den Plasmagruppen, Unterschiede vorfinden, ist

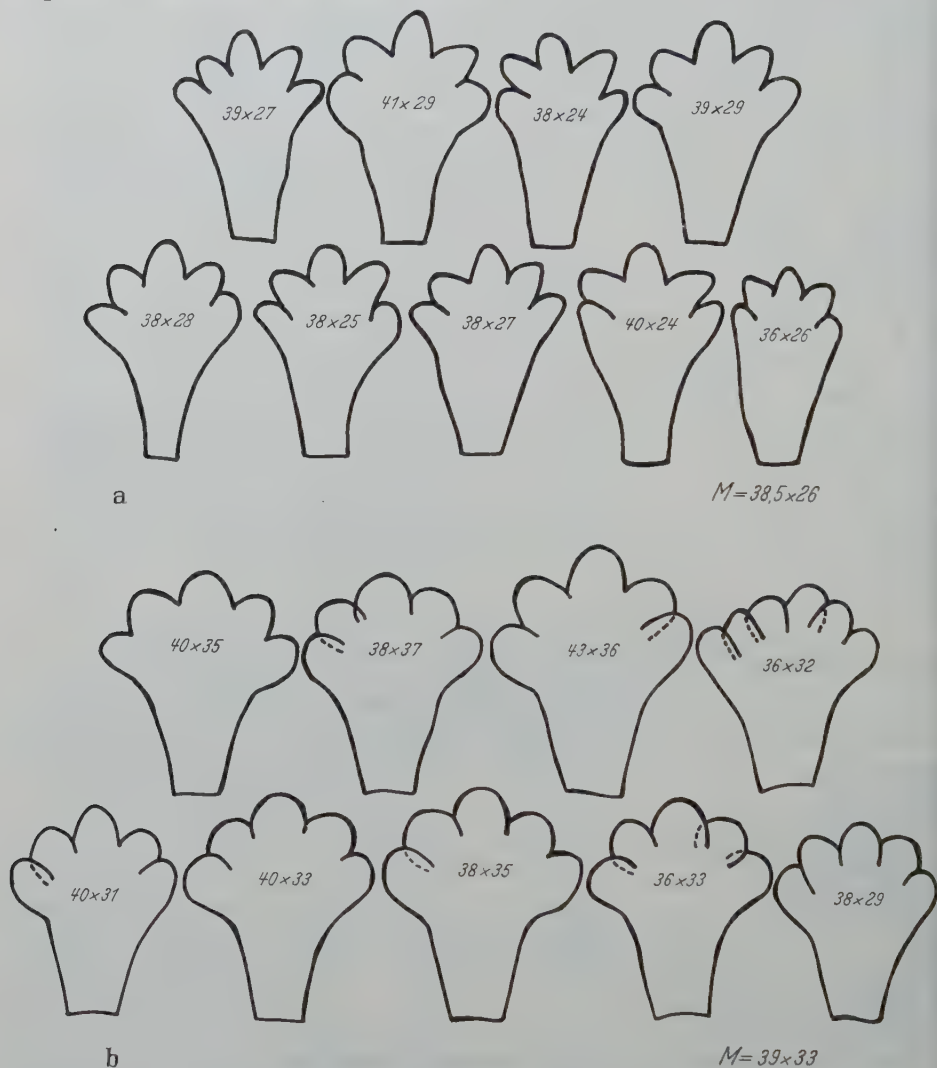


Abb. 2 a u. b. Blüten von: a *Str. (cyaneus × solenanthus)*, b *Str. (solenanthus × cyaneus)*. Die Kronröhren sind aufgeschnitten und die Umrisse abgezeichnet

zunächst festzustellen, wie groß die Varianzen sind und ob diese sich untereinander signifikant unterscheiden lassen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse einer Varianzanalyse zusammengestellt. Dabei läßt sich nun deutlich erkennen, daß die größte Varianz die der Kreuzungen ist. Sie ist erheblich größer als die Restvarianz ($P < 0,001$). Sodann ist die Varianz der Kreuzungen auch noch signifikant von der Varianz der einzelnen Zählungen zu unterscheiden ($P < \text{als } 0,02$

und $>0,01$). Das bedeutet, daß sich die Sterilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Kreuzungen sichern lassen. Bei einem Vergleich der Summen von sterilen Pollenkörnern pro Kreuzung ergibt sich dann auch noch, daß sich außer bei Nr. 102, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* Basel) und Nr. 104, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* albus) jede Summe von allen anderen unterscheidet. Der Bastard mit der geringsten Sterilität ist Nr. 106 *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* type), derjenige mit der höchsten Nr. 101 *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*).

Wir stellen ferner gesicherte Differenzen zwischen den reziproken Bastarden fest. Das geht schon als höchst wahrscheinlich aus dem Varianzquotienten $\frac{\text{Plasmagruppen}}{\text{Rest}}$ hervor. Eine Berechnung des mittleren Fehlers der Differenz aus den Einzeldifferenzen der reziproken Kreuzungen, die miteinander in korrelativer Beziehung stehen, ergibt folgendes:

	$\bar{D}$	$\bar{D}^2$
<i>sol</i> $\times$ <i>cy</i> — <i>cy</i> $\times$ <i>sol</i>	140	19600
<i>sol</i> $\times$ <i>RB</i> — <i>RB</i> $\times$ <i>sol</i>	166	26556
<i>sol</i> $\times$ <i>Ra</i> — <i>Ra</i> $\times$ <i>sol</i>	99	9801
<i>sol</i> $\times$ <i>Rt</i> — <i>Rt</i> $\times$ <i>sol</i>	108	11664
Summe	513	67621

$$(S\bar{D})^2 = 263\,169$$

$$n = 4$$

$$\text{Mittlere Differenz } D = \frac{S\bar{D}}{n} = \frac{513}{4} = 128,2.$$

$$\begin{aligned} \text{Mittlerer Fehler dieser Differenz } m_D &= \sqrt{\frac{S\bar{D}^2 - \frac{(S\bar{D})^2}{n}}{n(n-1)}} \\ &= \sqrt{\frac{67621 - \frac{263169}{4}}{4(4-1)}} = \sqrt{\frac{67621 - 65792,25}{12}} = \sqrt{152} = \pm 12,3. \end{aligned}$$

Verhältnis der mittleren Differenz D zum mittleren Fehler dieser Differenz

$$t = \frac{D}{m_D} = \frac{128,2}{12,3} = 10,4 \text{ bei } FG = n - 1 = 3.$$

Diesem Verhältnis entspricht ein $P < 0,01$; das bedeutet, daß die oben angegebene mittlere Differenz rein zufällig nur einmal unter 100 Versuchen auftreten kann. Es ist also wahrscheinlich, daß sie ihre Ursache in einem realen Plasmaunterschied hat. Es ist außerdem feststellbar, daß jeweils in dem Plasma von *Str. solenanthus* alle Bastarde eine geringere Pollensterilität aufweisen als in den Plasmen von *Str. cyaneus* und den verschiedenen *Rexii*-Formen. Der Unterschied ist freilich nur gering: er macht knapp 6% aus.

Endlich ist natürlich noch von Interesse, wie groß der Einfluß von 2 verschiedenen Zählterminen auf die Ergebnisse ist. Auch da lassen sich gewisse Unterschiede mit Hilfe der Restvarianz sichern. Der Varianzquotient $\frac{\text{Plasma}}{\text{Zählung}}$ ist jedoch nicht durchaus signifikant. Für die Differenzen der Mittelwerte der einzelnen Zähltermine finden wir Wahrscheinlichkeiten von $P < 0,001$ bei den Kreuzungen Nr. 105 und 104 *Str. (Rexii* albus $\times$ *solenanthus*) und reziprok,

sowie bei Nr. 107, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus)*. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $P = 0,01$ bei Nr. 106, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii type)* und endlich eine solche von $P = 0,02$ bei Nr. 104, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus)*. Bei allen anderen Kreuzungen fällt die Differenz in den Bereich des zufälligen Fehlers¹.

Diese Ergebnisse können freilich erst dann vollkommen verstanden werden, wenn folgendes mitberücksichtigt wird. In den Jahren 1952 und 1954 sind die Kombinationen Nr. 108 und 109, Nr. 111 und 112, *Str. Rexii albus* $\times$ *solenanthus*) und reziprok, und Nr. 110, 113 und 114, *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus)* und reziprok, noch einmal aufgezogen worden (Tabelle 4).

Tabelle 4. Mittelwerte der Pollensterilität in den entsprechenden Kreuzungen
Mittelwerte in Prozent

Auf- zuchts- jahr	<i>sol</i> $\times$ <i>Ra</i>	<i>Ra</i> $\times$ <i>sol</i>	<i>cy</i> $\times$ <i>sol</i>	<i>sol</i> $\times$ <i>cy</i>
1950	Nr. 104 1949; 10 51,4	Nr. 105 1949; 9 56,3	Nr. 101 1949; 2 76,6	Nr. 100 1949; 1 69,6
1952	Nr. 108 1951; 92 80,1	Nr. 109 1951; 93 87,4		Nr. 110 1951; 98 83,8
1954	Nr. 111 1951; 92 81,1	Nr. 112 1951; 93 53,0	Nr. 113 1953; 64 77,1	Nr. 114 1953; 63 66,7

Vergleichen wir die Mittelwerte in Prozent, dann ergibt sich, daß sich die Sterilitätswerte von 1950 durchaus nicht immer wieder genau reproduzieren. Wenn sie jedoch von den 1950 gezählten abweichen, dann ist das in der Richtung erhöhter Sterilität. Das kann durchaus von den Außenbedingungen abhängen. Daß diese einen Einfluß haben, ist oben gezeigt worden. Auffällig ist lediglich, daß einmal bei der Aufzucht von 1954 derselben Kreuzung zwischen *Str. solenanthus* und *Rexii albus* und reziprok, natürlich aus verschiedenen Fruchtkapseln, in der Kombination mit *Str. solenanthus* als Mutter die höhere Sterilität vorkommt. Indessen ist diese Abweichung möglicherweise erklärbar. Es hat sich herausgestellt, daß in der F_1 gerade dieser Kreuzung eine große Anzahl von Formen mit erhöhter Chromosomenzahl auftreten, jedoch, wie spätere Versuche ergeben haben, keineswegs bei jeder Kreuzung in derselben Anzahl. Möglicherweise hängen diese beiden Erscheinungen zusammen. Die übrigen Sterilitätswerte stimmen durchaus in der Richtung, in der sie reziprok voneinander abweichen, mit den Werten von 1950 überein.

Zusammenfassend kann man zu der F_1 folgendes sagen. Unser Material zeigt in beiden reziproken Kreuzungsrichtungen den Effekt der Pollensterilität. Diese ist quantitativ zwar nicht sehr nachdrücklich, eher geringfügig, aber immerhin gesichert zwischen den beiden Plasmagruppen unterscheidbar. Dabei ist im Plasma von *Str. solenanthus* stets eine geringere Sterilität. Abgesehen davon differieren fast alle Kreuzungen voneinander. Eine Zunahme der Fertilität im Laufe der Vegetationsperiode tritt reziprok bei den Kreuzungen Nr. 104 und 105, *Str. (Rexii albus* $\times$ *solenanthus)* und Nr. 106 und 107, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus)* auf. Das wären die wichtigsten Ergebnisse abgesehen davon, daß

¹ Zu der Berechnungsweise ist noch zu sagen, daß wir für die Tabellen die Prozentzahlen der Auszählungen benutzt haben, obwohl das nicht völlig korrekt ist. Nachdem jedoch nach einer Winkeltransformation dieser Werte und darauffolgender Varianzanalyse die gleichen Differenzen erschienen sind und sich als signifikant erwiesen haben, zeigte es sich, daß das Verfahren für unseren Fall keinen Fehler einschließt.

überhaupt eine Änderung innerhalb der Vegetationsperiode auch an den gleichen Pflanzen zu konstatieren ist.

Es wäre verfrüht, wollte man aus dieser immerhin geringen quantitativen Differenz bereits schließen, daß hier eine plasmonische Einwirkung auf die Pollensterilität vorliegt. Daß eine solche bestehen kann, hat MICHAELIS in seinen umfassenden Versuchen mit dem Bastard *Epilobium* (*luteum* $\times$ *hirsutum*) nachgewiesen. Seine Untersuchungen haben zwar den Vorzug einer Übersicht über außergewöhnlich zahlreiche aufeinanderfolgende Generationen, indessen den Nachteil, daß sie auf die Dauer nicht reziprok realisierbar sind. Bei den in dieser Arbeit behandelten *Streptocarpus*-Kreuzungen sind beide Reziproke gleichmäßig vital und lebensfähig. Um eine genauere Vorstellung von der Bedingtheit der Pollensterilität zu haben, ist es notwendig, noch einige F_2 -Kombinationen, vor allen Dingen aber die Rückkreuzungs-Nachkommenschaften jeweils mit dem väterlichen Elter zu betrachten.

2. Das Aussehen der F_2 -Kombinationen und der Rückkreuzungsgenerationen

Wir halten es für zweckmäßig, hier für die F_2 und für sämtliche Rückkreuzungsgenerationen die morphologisch-genetischen Grundlagen für sich zusammenzufassen, und dann erst in den folgenden Kapiteln genauer auf die Verhältnisse der Pollensterilität, des eigentlichen hier untersuchten Merkmals, einzugehen. Wir setzen diesen Teil in Kleindruck; indessen möchten wir ihn dennoch nicht fortlassen, weil eine ganze Reihe von anderen Arbeiten später darauf Bezug nehmen werden. Wir beginnen mit den *solenanthus-Rexii*-Kreuzungen; von denjenigen mit *cyaneus* haben wir nur eine den beiden Reziproken aufgezogen. So hängen wir sie am Schluß an.

a) Das Aussehen der F_2 . Nr. 115, *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii* Basel) selbstbestäubt. Hier erhielten wir eine Spaltung von 88 rosulaten Pflanzen und 6 unifoliaten. Das ideale Verhältnis wäre 88,1:5,9, es zeigt sich also eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem erwarteten Verhältnis von 15:1 (vgl. OEHLKERS 1938, S. 349 und 1942, S. 284). Die Blattgröße variiert sehr stark, ebenso die Blütengröße, und zwar sehr viel stärker als in der reziproken Kreuzung, nämlich von $3,4 \times 1,4$ bis $6,8 \times 4,4$. Dabei besitzen 17 Pflanzen Blüten, die länger sind als 5,8 cm und breiter als 3,2 cm, also 26% von den 66 beurteilten Pflanzen. Die Zahl der Infloreszenzen pro Blatt liegt zwischen 4 und weit über 10. 37 Pflanzen haben pro Infloreszenz nur 1—2 Blüten, keine über 10 von den 68 beurteilten Pflanzen. Die Blütenfarben verteilen sich folgendermaßen: 13 Pflanzen weiß, 42 Pflanzen blau und 9 Pflanzen blauviolett. Die Variation der Blütenzeichnung ist sehr breit. Wir halten es für zweckmäßig, in dieser Darstellung gleich hier die reziproken anzufügen, anders als das in den Tabellen über die Pollensterilität geschehen ist. Demgemäß befassen wir uns jetzt mit Nr. 118; *Str.* (*Rexii* Basel $\times$ *solenanthus*) selbstbestäubt. Die Spaltung nach rosulat ist wie 80:9 (das ideale Verhältnis für das von 15:1 wäre 83,4:5,6). Es stimmt also nicht ganz so haarscharf mit dem berechneten Wert überein, wie im reziproken Fall, liegt aber durchaus innerhalb der Fehlergrenze. Es variiert die Blattlänge und -breite, auch die Blütengröße. Die Blütengröße von $3,4 \times 1,6$ bis $5,6 \times 3,0$, also nicht so stark wie im Falle der reziproken im *solenanthus*-Plasma. Die Zahl der Infloreszenzen pro Blatt liegt zwischen 4 und weit über 10. 24 Pflanzen tragen pro Infloreszenz nur 1—2 Blüten, eine Pflanze über 10, von 53 beurteilten. Wir unterscheiden 3 Blütenfarben: weiß 17 Pflanzen, blau 33 Pflanzen, blauviolett 9 Pflanzen. Die Zeichnung des Mittelfeldes unterscheidet sich einmal in diffuse Vielstreifigkeit, in Zweistreifigkeit, dann Streifen im Schlund, und fehlende Zeichnung. Die Gesamtvariation der Blüten ist also ebenso wie in der reziproken Kreuzung sehr breit.

Die F_2 der Kombination *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii* albus) und reziprok wurde 1951 bereits aufgezogen, aber, wie aus der Tabelle hervorgeht, nicht systematisch auf ihre Pollensterilität hin untersucht, sondern damals lediglich auf ihr Aussehen hin beurteilt. Indessen fassen wir beide Gruppen, die von 1951 und die 1955 wieder aufgezogene — allerdings von einer anderen Ausgangskreuzung — unter der gleichen laufenden Nummer zusammen.

Nr. 116, *Str. (solenanthus × Rexii albus)* selbstbestäubt zerfällt bereits nach ihrer Blattform in 2 Gruppen: a) 16 Pflanzen mit steif abstehenden Blättern. Diese sind mit starken Rippen versehen und Blattmassen, die sich wulstig darüber hinauswölben. Die Blattränder sind kraus, die Blattfarbe dunkelgrün. 13 Pflanzen davon sind rosulat, 3 unifoliat. Die Blattgröße liegt bei 36×13 cm. Jedes Blatt trägt bis zu 8 Infloreszenzen mit 1—6 Blüten. Die Blüten sind einheitlich in der Form, $4,8 \times 2,4$ cm groß und haben ausgesprochen breite Blütenzipfel und eine breite Röhre und sind weißviolett behaart. Sie zeigen alle ein vielstreifiges Mittelfeld und schwache Schlundstreifung. Alle diese Pflanzen setzen Samen an; sie erwiesen sich später, ebenso wie ihre Nachkommen, als tetraploid. b) 30 Pflanzen sind mit herabhängenden kräftigen Blättern versehen, die etwas breiter sind als die von *Rexii albus*, aber stärker behaart. Alle 30 sind rosulat, jeweils das größte Blatt ist etwa 30 cm lang und 17 cm breit. Es trägt acht 1—6blütige Infloreszenzen. Die Blüten sind von verschiedener Form und Größe ($4,3$ bis $3,0$ cm lang und $2,0$ bis $1,4$ cm breit). Blütenzipfel und Röhren spalten in *solenanthus*- und *Rexii*-ähnliche. Ebenfalls spaltet die Zeichnung der Blüten. Der Samenansatz ist schlecht.

Ähnlich steht es mit der reziproken F_2 Nr. 119; *Str. (Rexii albus × solenanthus)* selbstbestäubt. Auch hier finden sich 2 Gruppen; die Gruppe a blühte bereits im Dezember 1951, 11 Pflanzen waren unifoliat, 10 rosulat. Die Blattfarbe ist glänzend dunkelgrün, da die Behaarung schwach ist. Pro Blatt finden sich 86blütige Infloreszenzen. Sie tragen weiße, violett behaarte Blüten, haben ein vielstreifiges Mittelfeld und diffuse Schlundstreifungen, dabei eine Größe von $5,5—6 \times 3$ cm. Die Pflanzen der Gruppe a erwiesen sich ebenso wie die der reziproken als tetraploid. Bei Selbstungen geben sie guten Samen und bleiben fortan konstant. Alle haben tadellosen Pollen, der größer ist als der der Ausgangsform. Gruppe b blühte erst 1952 und unterschied sich von a durch die Blattgröße. $a = 39 \times 20$ cm, $b = 30 \times 12$ cm. Auch hier zeigt jedes Blatt bis zu 8 Infloreszenzen mit 1—6 Blüten, aber die Infloreszenzachsen sind dünner und kürzer als bei a. Auch die Blütengröße variiert stärker, von $5,5 \times 3,5$ bis zu $2,6 \times 1,4$ cm. Eine Spaltung in der Ausprägung der Blütenzipfel wie auch der Zeichnung ist hier reziprok zu finden. Der Samenansatz ist schlecht. Alle 11 Pflanzen sind rosulat. 1955 wurden dieselben Nachkommenschaften wieder aufgezogen — wir verwenden die gleiche laufende Nummer — Nr. 116, *Str. (solenanthus × Rexii albus)* selbstbestäubt. Kreuzungsjahr 1954, also eine andere F_1 als vorher. Bis zum Oktober des Jahres 1955 kamen 30 von 39 Pflanzen zur Blüte. Dabei ist wichtig, daß sich in dieser Aufzucht keinerlei Pflanzen fanden, deren Habitus auf Polyploidie hindeutete, sondern alle gehören der oben angegebenen Gruppe b an. 30 von den 39 Pflanzen sind rosulat, 9 unifoliat, und es scheint darauf hinzudeuten, daß es sich in dieser Kombination bei dem Merkmal rosulat: unifoliat um eine 3:1-Spaltung handelt. Die Blattgrößen differieren sehr stark. Je Blatt finden sich 4—12 Infloreszenzen. An 6 Pflanzen sind diese ein- bis zweiblütig. Zwei Pflanzen haben mehr als 10 Blüten pro Infloreszenz. 25 von 27 Pflanzen haben weiße Blüten, 2 hellblaue. Auch hier spaltet die Blütenzeichnung in ein diffuses oder ein distinkt gezeichnetes Mittelfeld, und dazu mehr oder weniger starkes Auftreten der Schlundzeichnung. Zwei Pflanzen sind ohne jede Blütenzeichnung, die Infloreszenzachsen sind dünn, und ein Samenansatz bei Selbstung kaum vorhanden.

Die reziproke Kreuzung Nr. 119, *Str. (Rexii albus × solenanthus)* selbstbestäubt. Es blühten von 107 Pflanzen nur 76, also 69%. Wieder entspricht das Verhältnis rosulat: unifoliat etwa einem 3:1 Verhältnis, nämlich 77:30. Die Blattgröße differiert ebenso beträchtlich wie in der reziproken Kreuzung, und auch hier bewegen sich die Werte für die Blütengröße zwischen $3,8 \times 2,0$ und $5,4 \times 3,4$ cm. Pro Blatt 4—17 Infloreszenzen, 7 Pflanzen sind ein- bis zweiblütig, 18 haben mehr als 10blütige Infloreszenzen. 65 Pflanzen blühten weiß, 9 hellblau, und spalten in der Blütenzeichnung wie reziprok. Bei 6 Pflanzen fehlt jegliche Blütenzeichnung. Auch hier ist keinerlei Anzeichen von Polyploidie zu erkennen.

Nr. 117; *Str. (cyaneus × solenanthus)* selbstbestäubt. Leider wurde hiervon die reziproke Kreuzung nicht aufgezogen. Wir werden später sehen, daß das ein recht unglücklicher Zufall war. Die Nachkommenschaft spaltet in bezug auf die Wuchsform. 38 Pflanzen sind rosulat, 3 unifoliat. Das erwartete Verhältnis von 15:1 entspräche 38,4:2,6. Es ist also wiederum außerordentlich exakt realisiert. Ferner findet sich eine Spaltung nach der Blattgröße, nach der Blütengröße ($3,7 \times 2,0$; $3,8 \times 2,5$ bis herunter zu $2,4 \times 1,10$ cm). Die Zahl der Infloreszenzen pro Blatt schwankt zwischen 4 und 17. Vier Pflanzen von 36 haben über

10 Blüten pro Infloreszenz, 6 haben nur 1—2 Blüten. Die Blütenfarben verteilen sich folgendermaßen: rot 1, rosa 2, bläulich 2, blau 1, dunkelblau 4, violett 4, weiß 5, im ganzen 27 Pflanzen. Die Zeichnung der Blüten variiert von intensiver Vielstreifigkeit des Mittelfeldes über schwach vielstreifig bis zu zweistreifig sowie $\pm$ intensive Schlundstreifen bis zu ungezeichnet. 13 Pflanzen von 27 haben in den Blüten einen gelben Fleck. Die Pflanzen blühten erst 1952 und dann nur spärlich und wuchsen wenig freudig.

b) Das Aussehen der Rückkreuzungsgenerationen. Nr. 120; *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) $\times$ *cyaneus*. Die 90 aufgezogenen Pflanzen sind bereits erstaunlich *cyaneus*-ähnlich. Alle sind rosulat, haben 7 und mehr Blätter und zeigen kaum Spaltung in Blattfarbe und Blattgestalt. Allerdings etwas nach der Blattbreite. Die Infloreszenzen sind ein- bis höchstens zweiblütig, Blütenformen wie bei *cyaneus*, die Blütenfarben spalten in 14 dunkelrot-violette, 24 rosafarbene, 12 hellrotviolette, 11 hellblaue und nach der Intensität der Streifung des Mittelfeldes. Alle Pflanzen haben den gelben Fleck. Wir schließen hier gleich die weiteren Rückkreuzungsnachkommenschaften an. In der R_2 , Nr. 128; *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) $\times$ *cyaneus* $\times$ *cyaneus* spaltet nur noch die Zeichnung des Mittelfeldes etwa 1:1 intensiv zu schwach. Sonst ist kein Unterschied mehr von *cyaneus* zu finden. In der R_3 , Nr. 141 (vgl. Tabelle 6), spaltet die Zeichnung des Mittelfeldes immer noch. Die Infloreszenzen haben 1—3 Blüten. Die R_4 (vgl. Tabelle 7), Nr. 151, ist durchaus *cyaneus*-ähnlich, aber viel kräftiger entwickelt als *Str. cyaneus*. Die Blattgröße ist 18×8 cm gegenüber 14×5 bei *Str. cyaneus*. Die Infloreszenzen sind 1—2blütig, das Mittelfeld der Blüten ist jetzt einheitlich dunkelrot gezeichnet. Ein gelblichgrüner Fleck sitzt tief im Schlund. Damit haben wir eine Übersicht über die Rückkreuzungsgenerationen von *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) gewonnen.

Sehr wichtig erweist sich die Gegenkreuzung, weil in dieser eine ausgesprochene Differenz gegenüber der reziproken auftritt. Bei der R_1 , Nr. 124; *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *solenanthus* (vgl. Tabelle 5) tritt eine unterschiedliche Entwicklung der Keimlinge auf, die sich sehr bald nach der Aussaat bereits feststellen läßt. Nach 3 Monaten unterscheidet man 3 Blattformgruppen: 1. rundeiförmig mit geringer Spitze, *solenanthus*-ähnlich; 2. Blatteiförmig, Spitze betont. 3. Blatt mehr oder weniger schmal, Rand gewellt und deformiert. In jeder Gruppe ließ sich nun, abgesehen davon, noch sehr verschiedene Entwicklungsfreudigkeit feststellen. Die Häufigkeit in den Klassen war folgende: 1. groß 6, mittel entwickelt 15, klein 9, zusammen 24. 2. Groß 4, mittel 10, klein 8, zusammen 22. Beide, Klasse 1 und 2 zusammen 46. 3. Groß 29, mittel 62, klein 52, zusammen 143. 1951 kamen nur 14 Pflanzen zur Blüte, 1952 blühten weitere 14, jedoch nur spärlich. Der Rest vergrünte oder die Blumenkronen fielen frühzeitig ab. Von 48 Pflanzen sind jetzt noch 43 rosulat und 5 unifoliat, alle tragen vielblütige Infloreszenzen, bis zu 28 Blüten. Von 12 bis zu 28 cm Höhe und kleine weiße bis schwach violett getönte Blüten mit starker Schlundstreifung. Die Form der Blütenzipfel spaltet, die Blütengröße liegt zwischen $3 \times 1,5$ cm und $1,5 \times 0,8$ cm.

Die R_2 des folgenden Jahres (vgl. Tabelle 6, Nr. 134) sieht im Mai des Jahres 1952 folgendermaßen aus: Blätter rund eiförmig, Spitze mehr oder weniger betont, groß 34, mittelgroß 14, zusammen 48. Blatt mehr oder weniger schmal, Blattrand gewellt und deformiert; mittelgroß 125, klein 22, zusammen 147. Die Pflanzen sind von wenig freudigem Wuchs, vorwiegend unifoliat, und sie bleiben sehr verschieden in der Blattform. Pro Blatt entstehen 1—2 Infloreszenzen, die gewöhnlich nicht über 15 cm hoch werden und 1—2 bzw. mehrblütig sind. Die Blütenfarbe ist weiß, die Zeichnung spaltet noch in mehr oder weniger starke oder fehlende Schlundstreifung. Die R_3 (Nr. 146, Tabelle 6) bringt die Schmalblättrigkeit wiederum, und wieder ist die Klassifizierung dieses Merkmals sehr schwer, weil die Übergänge von normal bis zu völlig deformiert gleitend sind. Blatt rund-eiförmig, Spitze mehr oder weniger betont, groß 15, mittelgroß 28, Blatt schmal, Blattrand gewellt und deformiert, Unterschied zwischen mittelgroß und klein ist hier nur noch schwer zu treffen, 264. Es sei nur bemerkt, daß die Blattspreite zuweilen fast bis auf die Mittelrippe reduziert ist und daß vielfach ein Aussehen auftritt wie das von LAWRENCE 1947 beschriebene bei seinen subletalen Typen von *Str. Rexii*.

Auch die deformierten beginnen in allen Rückkreuzungskombinationen mit der Blütenbildung. Pro Blatt werden bis zu 6 Infloreszenzen gebildet. Diese sind nur selten *solenanthus*-ähnlich, häufig bilden sie ein dichtes Knäuel und pro Infloreszenz nur wenige, 6—10 Blüten. Die Infloreszenzhöhe variiert zwischen 20 und 25 cm, die Infloreszenzachsen sind grün und an der Spitze rot überlaufen, Blütengröße 3×1 cm. Bei den schmalblättrigen Formen sind

auch die Blütenzipfel um ein wenig schmäler als bei den mehr oder weniger normalblättrigen. Die Blütenfarbe ist einheitlich weiß, ebenso die Schlundstreifung. Damit sei die Beschreibung der Rückkreuzungsgenerationen dieser *cyaneus* $\times$ *solenanthus*-Kreuzungen abgeschlossen. Wir kommen an anderer Stelle noch einmal auf die Erbllichkeit der Schmalblättrigkeit, die offenbar wiederum eine bestimmte genisch-plasmonische Grundlage besitzt, zurück.

Es folge die R_1 der Kreuzung Nr. 122; *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) $\times$ *Rexii albus*. Leider gelang es uns davon nur 7 Pflanzen aufzuziehen. Möglicherweise hängt diese geringe Zahl von Nachkommen mit der in der F_2 beobachteten Polysomie und Polyploidie zusammen. Die Pflanzen sind bereits ziemlich *Rexii albus*-ähnlich, doch haben sie vielfach noch mehrblütige Infloreszenzen. Die R_2 -Nachkommenschaften, also Nr. 131 und 132, sind recht einheitlich, die Infloreszenzen 1—2blütig, die Blütengröße $5,6 \times 3,5$ cm mit weißen Blüten und vielstreifigem Mittelfeld. Von der R_3 ab, Nr. 143 und 144, sind die Nachkommenschaften unverändert gleich *Rexii albus*, ebenso verhalten sich alle drei R_4 -Nachkommenschaften (vgl. Tabelle 7).

Die reziproke Form Nr. 126, *Str.* (*Rexii albus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *solenanthus*. Die Pflanzen sind in ihrem Aussehen bereits *solenanthus* stark angeglichen. Von 34 sind nur noch 2 zweiblättrig. Die Infloreszenzen sind reichblütig, alle Blüten weiß, Spaltung nach der Behaarung der Blätter, der Farbe der Infloreszenzachsen, Zeichnung der Blüten und der Höhe der Infloreszenzen. Von der R_2 wurden unter Nr. 137 und 138 zwei Kombinationen aufgezogen, es sind im ganzen 328 Pflanzen. Diese sind unifoliat mit ausgeglichener Blattform, unterschieden jedoch in der Wüchsigkeit; sie bilden pro Blatt 5—6 vielblütige Infloreszenzen. Es variieren Blütenzeichnung und Blütengröße, Farbe der Infloreszenzachsen und die Blütezeit. In der R_3 Nr. 148 und 149 unterscheiden sich die beiden aufgezogenen Linien etwas voneinander. Nr. 148 hat nicht sehr kräftig entwickelte Pflanzen, die aber früh blühen. Es variiert die Blattgröße von $24\text{—}15$ cm $\times$ $18\text{—}14$ cm. Ebenso ist die Infloreszenzhöhe und die Blütenzeichnung noch nicht ganz einheitlich. Nr. 149 enthält 60 sehr kräftig entwickelte Pflanzen mit Blattgrößen von 30×26 cm bis 25×15 cm. *Str. solenanthus* selbst besitzt 30×23 cm. Hier spaltet aber noch die Farbe der Infloreszenzachsen nach den vorhin schon genannten Merkmalen. Auch in der R_4 unterscheiden sich die beiden aufgezogenen Linien noch ein wenig von *solenanthus*. Nr. 159 sind zwar die Blätter recht gleichmäßig groß, doch ist die Blattspitze noch mehr oder weniger vital und vor der Infloreszenz liegen die Rippen noch nicht so dicht beieinander und die Interkostalfelder wölben sich nicht so stark vor wie bei *Str. solenanthus*. Die Farbe der Infloreszenzachsen spaltet noch und die Schlundstreifung ist noch etwas intensiver als bei *Str. solenanthus*. Bei Nr. 160 ist die Blattgröße nicht ganz einheitlich, während die Blattfarbe der von *Str. solenanthus* durchaus entspricht. Hier spalten die Infloreszenzfarbe und -höhe, die Höhe der Infloreszenzachsen und ihre Farbe, doch ist hier die Schlundstreifung überall gleichmäßig schwach.

Die Rückkreuzungsgenerationen der beiden anderen Kombinationen *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii Basel*) und (*solenanthus* $\times$ *Rexii type*) können zusammen behandelt werden. Bei der R_1 von Nr. 121, *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii Basel*) $\times$ *Rexii Basel* wird der väterliche Typ relativ schnell erreicht. In der R_1 finden wir 51 rosulate Pflanzen mit 2—5 Blättern, die nach der Blattfarbe spalten und höchstens zweiblütige Infloreszenzen besitzen. Die R_1 von Nr. 123, *Str.* (*solenanthus* $\times$ *Rexii type*) $\times$ *Rexii type* bietet kein anderes Bild. In der R_2 Nr. 130 von der Kreuzung mit *Str. Rexii Basel* ist die Zeichnung der Blüten noch einigermaßen diffus und spaltet ein wenig. In der R_3 der entsprechenden Kreuzung mit *Rexii type* Nr. 133 (Tabelle 6) finden sich nur rosulate Pflanzen mit 1—3blütigen Infloreszenzen. Die Blütenfarbe spaltet noch ein wenig in stärker und schwächer blau. Das Mittelfeld der Blüten ist einheitlich intensiv vielstreifig. R_3 und R_4 dieser Form entsprechen sehr weitgehend *Rexii Basel* und *Rexii type*.

Es ist bemerkenswert, daß die Rückkreuzung der R_4 mit *Str. Rexii type*, der Mutter als väterlichem Elter, Nr. 166 in Pflanzen mit blauen und weißen Blüten spaltet, 53:26, was bedeuten kann, daß die R_4 noch nicht ganz vollständig *Str. Rexii type* entsprochen hat.

Die reziproke R_1 mit *Str. Rexii Basel* wird ebenfalls wieder mit derjenigen von *Str. Rexii type* zusammengekommen. Nr. 125 *Str.* (*Rexii Basel* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *solenanthus* brachte schon weitgehend *solenanthus*-ähnliche Formen. Unter 47 sind nur 16 mit mehr als 1 Blatt. Auch hier spaltet die Farbe der Infloreszenzachse und ihre Höhe, dazu Blütenfarbe und

-zeichnung. Sehr ähnlich ist die R_1 von *Rexii* type, Nr. 127 *Str.* (*Rexii* type $\times$ *solananthus*) $\times$ *solananthus*. Dort haben unter 96 Pflanzen 49 mehr als 1 Blatt.

Von der R_2 wurden von jeder Kombination 2 Linien aufgezogen, Nr. 135 und 136 und Nr. 139 und 140. Unter den insgesamt 185 Pflanzen der ersten Kombination sind 3 Pflanzen mit mehr als 1 Blatt. Alle anderen sind in der Blattform und in der Wüchsigkeit noch nicht sehr ausgeglichen. Die Farbe der Infloreszenzachsen und ihre Höhe spaltet noch, die Blüten sind alle weiß, jedoch verschieden gezeichnet. Es finden sich außerdem Unterschiede in der Blütenform: die Blütenzipfel sind breiter als bei *Str. solananthus*. Nr. 139 und 140 unterscheiden sich nicht von der eben geschilderten Linie. Die R_3 Nr. 147 und 150 bringen kräftig entwickelte Pflanzen, die in der Blattgröße einheitlicher sind als im Vorjahr. Die Blattspitze ist allerdings noch vitaler als bei *Str. solananthus*. Die Infloreszenzen sind aber einheitlich, die Blütenzeichnung spaltet noch. Die R_4 Nr. 158 ist einheitlich großblättrig, die Infloreszenzen sind recht lang (45 cm) und die Pflanzen blühen früh. Abweichend von *Str. solananthus* ist immer noch die vitale Blattspitze, die etwas weniger stark gekrauste Blattbasis, die die Infloreszenz nicht so stark umfaßt wie bei reinem *solananthus*. In der R_4 , Nr. 161, ist die Einheitlichkeit der Nachkommenschaft hier zum erstenmal durch das Auftreten von Pflanzen mit Blattwucherungen und verkorkten Rissen auf den Blättern gestört. Es sind von der gleichen Kreuzung mehrere Linien aufgezogen, die sich in ihrer Wüchsigkeit unterscheiden; das bedeutet, daß die R_3 noch nicht ganz einheitlich war.

Damit seien die Mitteilungen über das Aussehen der F_2 und der Rückkreuzungsnachkommenschaften abgeschlossen. Auch auf die letztgenannten eigenartigen Deformationen der Blätter soll später an anderer Stelle noch einmal zurückgegriffen werden. Auch das ist zweifellos eine besondere Eigentümlichkeit bestimmter Kombinationen.

3. Die Pollensterilität der F_2 -Kombinationen und der ersten Rückkreuzungsgeneration mit dem väterlichen Elter

Das Material wird in Tabelle 5 zusammengefaßt. Wir haben nur von wenigen Kombinationen eine F_2 aufgezogen; dennoch sagen sie einiges aus, doch ist es ratsam, sie gleich in Zusammenhang mit der ersten Rückkreuzungsgeneration zu verwenden.

In der vorher behandelten F_1 hatten wir es mit Pflanzen größtmöglicher genischer Heterozygotie zu tun. Gleichzeitig muß aber von dieser Generation eine weitgehende Uniformität erwartet werden, da die Ausgangsformen ja beide homozygotisch waren. Ein Maß dafür ist für uns der aus den einzelnen Werten jeder Kreuzung errechnete Varianzwert (σ^2), selbstverständlich allein auf das von uns untersuchte Merkmal, die Pollensterilität, bezogen. Das trifft durchaus zu; denn sowohl in der F_2 als auch in der R_1 , der ersten Rückkreuzungsgeneration, ist die Varianz gegenüber der F_1 erheblich erhöht.

Überlegen wir zunächst, wie sich diese Generationen verhalten müßten, falls die beobachtete Bastardsterilität allein von den im Kern lokalisierten, also den genischen Erbfaktoren, hervorgerufen worden wäre. Es könnte dann die Sterilität der F_1 bei einer größeren oder kleineren Individuenzahl, je nachdem wieviel solcher Faktoren die Sterilität bedingen, in der ersten Rückkreuzungsgeneration wieder auftreten. Sofern 2 additive Faktoren daran beteiligt wären, in 25%, bei 3 solcher Faktoren in 12, bei 4 Faktoren in 6,25%. Von allen übrigen Pflanzen aber muß angenommen werden, daß sie in höherem Maße homozygotisch sind als die F_1 . Es wäre also zu erwarten, daß der Mittelwert der Sterilität dieser Kombinationen absinkt, und es könnten möglicherweise bereits voll fertile Pflanzen auftreten. Von der F_2 muß gegenüber der R_1 , der ersten Rückkreuzungsgeneration mit dem väterlichen Elter, erwartet werden, daß sie eine breitere Streuung der Sterilitätsgrade aufweist; möglicherweise wird die Sterilität infolge

Tabelle 5. Statistische Vergleichsdaten über die Pollensterilität der F_1 , F_2 und der R_1

F ₁				F ₂				R ₁								
Kreuzungs- nummer	Aufzuchtjahr 1950			Frei- heits- grad	Kreuzungs- nummer	M	± m	m ²	σ ²	Frei- heits- grad	Kreuzungs- nummer	Aufzuchtjahr 1951			Frei- heits- grad	
	M	± m	m ²									M	± m	m ²		σ ²
Nr. 100 1949; 1 <i>sol</i> × <i>cy</i>	70	0,7	0,47	9,4	19						Nr. 120 1950; 33 (<i>sol</i> × <i>cy</i>) × <i>cy</i>	70	3,9	15,3	800,5	1
Nr. 102 1949; 4 <i>sol</i> × <i>RB</i>	54	1,1	1,15	23,0	19						Nr. 121 1950; 32 (<i>sol</i> × <i>RB</i>) × <i>RB</i>	82	2,8	8,05	322,6	39
Nr. 104 1949; 10 <i>sol</i> × <i>Ra</i>	51	1,3	1,88	37,1	19						Nr. 122 1950; 29 (<i>sol</i> × <i>Ra</i>) × <i>Ra</i>	71	9,4	90,2	632,0	6
Nr. 106 1949; 12 <i>sol</i> × <i>Rt</i>	28	1,5	2,19	43,8	19						Nr. 123 1950; 28 (<i>sol</i> × <i>Rt</i>) × <i>Rt</i>	80	2,9	7,45	365,0	48
Nr. 101 1949; 2 <i>cy</i> × <i>sol</i>	77	1,0	1,07	21,5	19						Nr. 124 1950; 34 (<i>RB</i> × <i>sol</i>) × <i>sol</i>	88	2,2	5,04	141,3	27
Nr. 103 1949; 3 <i>RB</i> × <i>sol</i>	62	1,1	1,14	22,9	19						Nr. 125 1950; 31 (<i>RB</i> × <i>sol</i>) × <i>sol</i>	88	3,2	10,8	412,2	37
Nr. 105 1949; 9 <i>Ra</i> × <i>sol</i>	56	1,5	2,28	40,4	19						Nr. 126 1950; 30 (<i>Ra</i> × <i>sol</i>) × <i>sol</i>	93	4,0	16,02	272,5	16
Nr. 107 1949; 11 <i>Rt</i> × <i>sol</i>	34	2,1	4,33	86,5	19						Nr. 127 1950; 27 (<i>Rt</i> × <i>sol</i>) × <i>sol</i>	91	2,1	4,32	208,3	47

gleichsinniger additiver Genwirkung bei einer Anzahl von Individuen durch Transgression sogar erhöht. Geringere Sterilität als in der F_1 ist ebenfalls für einen Teil der F_2 zu erwarten.

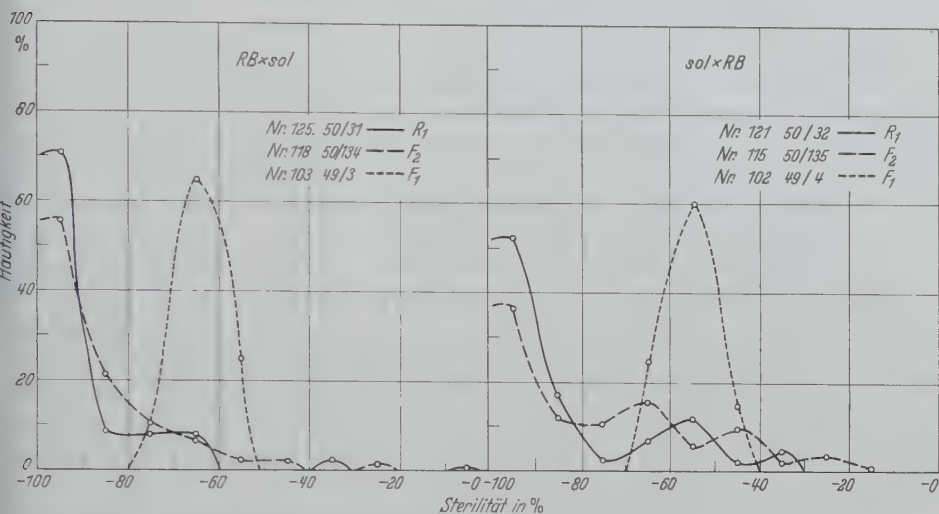


Abb. 3. Verteilung der Sterilitätstypen nach Klassen, die sich um 10 % unterscheiden

Die Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Es stellt sich nun heraus, daß die oben entwickelte Annahme nicht zutreffen kann, denn nicht nur in der F_2 , in der es möglich wäre, sondern auch in fast allen R_1 -Populationen zeigt sich eine höhere Sterilität als in der F_1 . Die Differenzen zwischen F_2 und R_1 liegen innerhalb der Fehlergrenze.

Wie unterscheiden sich aber nun die Varianzen? Sie sind in der R_1 alle signifikant größer als in der F_1 . Die geringste Wahrscheinlichkeit für den Unterschied in der Variationsbreite der Sterilität ($P=0,05$) findet sich zwischen Nr. 107; *Str. (Rexii type × solenanthus)* und der Nr. 127, *Str. (Rexii type × solenanthus) × solenanthus*.

Die hohe Varianz der F_1 war hier jedoch eine Folge der Veränderlichkeit im Laufe der Vegetationsperiode, auf die wir dort bereits hinwiesen. Die Varianzen der F_2 sind in keinem Fall größer als die der F_1 und im Falle der F_2 von Nr. 119, *Str. (Rexii albus × solenanthus)* sogar signifikant kleiner. Was die Reziprozität der Unterschiede anlangt, so ist festzustellen, daß auch bei der R_1 im *solenanthus*-Plasma die Mittelwerte im großen und ganzen niedriger liegen

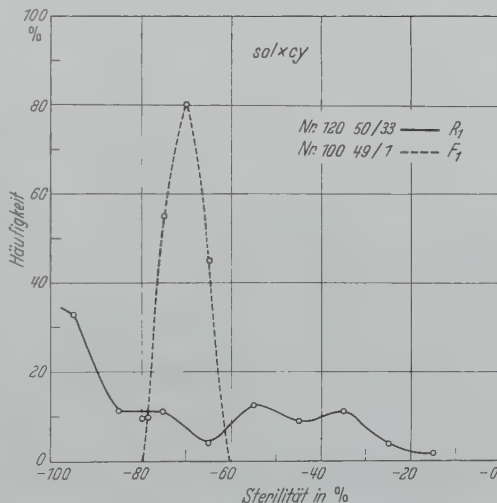


Abb. 4. Verteilung der Sterilitätstypen nach Klassen, die sich um 10 % unterscheiden, in der F_1 und R_1 von *Str. (solenanthus × cyaneus)* (vgl. Text)

als in den *Rexii*- und *cyaneus*-Plasmen. Der Unterschied beträgt hier 8%. Doch lassen sich reziproke Unterschiede statistisch nur noch zwischen den *cyaneus* $\times$ *solananthus*- (Nr. 120 und 124) und zwischen den *Rexii type* $\times$ *solananthus*-Kreuzungen (Nr. 123 und 127) sichern.

Ordnet man die Mittelwerte der Sterilität von den jeweils 4 Blüten einer Pflanze in Klassen, die sich um 10% Sterilität unterscheiden, so findet man durchweg schiefe Verteilungen. Ein Beispiel davon möge in Abb. 3 graphisch dargestellt werden. Es gibt Pflanzen, die fertiler sind als die F_1 ; doch liegt ihre Anzahl bei 2—5%. Eine Ausnahme von dieser Regel findet sich, nämlich Nr. 120, *Str. (solananthus* $\times$ *cyaneus*) $\times$ *cyaneus*. Hier besitzen 39% aller R_1 -Pflanzen eine geringere Sterilität als die F_1 (vgl. Abb. 4). Bei den Rückkreuzungen mit *Str. cyaneus* und den verschiedenen *Rexii*-Formen als Vätern umfaßt die Klasse der Pflanzen mit einer Sterilität zwischen 90 und 100% in der Kombination mit *cyaneus* 33%, mit *Rexii Basel* 53%, mit *Rexii albus* 29% und mit *Rexii type* 35%. Bei den Rückkreuzungen mit *solananthus* als Vater umfaßt die gleiche Klasse in der Kombination mit *cyaneus* 57%, mit *Rexii Basel* 71%, mit *Rexii albus* 88% und mit *Rexii type* 73% der Individuen. In der F_2 *Str. (solananthus* $\times$ *Rexii Basel*) haben 37%, in der reziproken *Str. (Rexii Basel* $\times$ *solananthus*) 56% eine ebenfalls so hohe Sterilität.

Als Ergebnis dieses Abschnitts läßt sich also folgendes zusammenfassen: 1. Die Varianz hat in der F_2 und in der R_1 zugenommen, d. h. also, die Uniformität der F_1 ist verschwunden, anders ausgedrückt, es handelt sich um eine umfassende genische Umkombination. 2. Als Folge dieser genischen Umkombination erscheint aber nicht eine Erhöhung der Fertilität, sondern eine Erhöhung der Sterilität. Das ist nur erklärbar, wenn man annimmt: das Merkmal der Pollensterilität sei nicht allein von den Genen gesteuert, sondern von einer Wechselwirkung zwischen Genom und Plasmon. So tritt also hier in beiden reziproken Kreuzungen das gleiche Phänomen zutage, nämlich Pollensterilität gesteuert durch eine Disharmonie zwischen bestimmten Genkombinationen und dem jeweiligen Plasmon. Dabei finden sich auch hier noch, wenn auch in geringerem Umfang, reziproke Verschiedenheiten. Das ist unter der Annahme zu verstehen, daß das *solananthus*-Genom in geringerem Maße Gene enthält, die sich im Hinblick auf die Pollenausbildung als disharmonisch mit dem Plasmon der *cyaneus*- und *Rexii*-Formen erwiesen, als das in der reziproken Kombination der Fall ist. Daß sich die F_2 so wenig von der Rückkreuzung unterscheidet, kann durch die Vielfältigkeit der Faktoren im Genom und die damit verbundene geringere Wahrscheinlichkeit des Auftretens der zum Plasmon gehörigen Homozygoten bedingt sein. Außerdem ist die Zahl der Pflanzen, die in der F_2 90—100% sterilen Pollen haben, geringer als in der entsprechenden R_1 . Das kann — durchaus wie zu erwarten — die Folge davon sein, daß hier die Zahl der Homozygoten geringer ist. 3. Die Tatsache, daß es neben den zahlreichen hochsterilen Pflanzen auch solche gibt, die in höherem Maße *fertil* sind als die F_1 (in einem Fall sogar in 39% aller R_1 -Pflanzen), läßt darauf schließen, daß es neben der „normalen“ Wechselwirkung Genom-Plasmon noch eine „anormale“ gibt. Solche Pflanzen haben möglicherweise ein „Mischplasma“ durch Plasmaübertritt durch den Pollenschlauch. Im folgenden sei erörtert, wie weit die Bearbeitung von 3 weiteren Rückkreuzungsgenerationen sowie die einer Einkreuzung mit dem mütterlichen

Tabelle 6. Statistische Vergleichsdaten über die Pollensterilität der R_2 und R_3

Die Tabelle ist etwas vereinfacht dargestellt. Die Kombinationen sind allein links am Rande angegeben, wobei die Anzahl der Rückkreuzungen den Generationen entsprechend zu ergänzen ist. Also beispielsweise für die $R_2 = Str. (sol \times cy) \times cy \times cy$ und für die $R_3 = Str. (sol \times cy) \times cy \times cy \times cy$. Bei den Kreuzungsummern sind immer die darüberstehenden Jahreszahlen zu ergänzen.

Kombination	R ₂							R ₃						
	1951 Kreuzungs- nummer	Sterilitäts- zustand der Mutter- pflanze	Aufzuchtjahr 1952				F/G	1952 Kreuzungs- nummer	Sterilitäts- zustand der Mutter- pflanze	Aufzuchtjahr 1952				F/G
			M	±m	m ²	σ ²				M	±m	m ²	σ ²	
<i>sol</i> × <i>cy</i> . .	Nr. 128, 57/33 Nr. 129, 57/32	100 41	90 36	2,5 2,8	6,54 8,23	309,7 395,1	46 47	Nr. 141, 101/10	100	78	3,3	10,78	647,0	59
<i>sol</i> × <i>RB</i> .	Nr. 130, 56/18	81	84	2,8	8,50	502,0	58	Nr. 142, 112/56	99	97	1,1	1,22	76,1	59
<i>sol</i> × <i>Ra</i> . .	Nr. 131, 53/4 Nr. 132, 53/6	98 41	41 13	3,7 1,8	13,53 3,31	663,3 165,7	48 49	Nr. 143, 111/24 Nr. 144, 110/14	98 8	69 10	4,4 2,9	19,32 8,47	1159,7 482,5	59 58
<i>sol</i> × <i>Rt</i> . .	Nr. 133, 52/27	96	85	2,7	7,39	443,6	59	Nr. 145, 109/15	100	74	3,4	11,50	692,0	59
<i>cy</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 134, 58/4	100	93	2,2	4,89	195,5	39	Nr. 146, 102/27	100	98	0,8	0,69	41,5	59
<i>RB</i> × <i>sol</i> .	Nr. 135, 55/16 Nr. 136, 55/19	100 98	82 36	4,0 3,3	16,27 11,37	813,6 568,7	49 49	Nr. 147, 107/16	100	20	3,4	12,5	722,9	59
<i>Ra</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 137, 54/16 Nr. 138, 54/17	100 57	70 59	6,9 4,0	48,80 16,09	1854,6 804,5	38 49	Nr. 148, 105/8 Nr. 149, 106/2	100 23	41 8	4,4 1,2	19,84 1,49	1178,5 89,7	59 59
<i>Rt</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 139, 51/17 Nr. 140, 51/10	97 98	88 60	2,8 4,3	7,95 18,70	397,5 935,5	49 49	Nr. 150, 104/8	100	42	4,7	22,68	1361,0	59

Tabelle 7. Statistische Vergleichsdaten über die Pollensterilität der R_4 sowie der Kreuzung der R_4 mit der jeweiligen Mutterpflanze als väterlichem Elter
Die Tabelle ist ebenso abgefaßt wie Tabelle 6.

Kombination	R ₄					R ₄ × Mutter								
	1953 Kreuzung Nr.	Sterilitäts- zustand der Mutter- pflanze	Aufzuchtjahr 1954				FG	1954 Kreuzung Nr.	Sterilitäts- zustand der Mutter- pflanze	Aufzuchtjahr 1955				FG
			M	± m	m ²	σ ²				M	± m	m ²	σ ²	
<i>sol</i> × <i>cy</i> . .	Nr. 151, 70/42	100	65	3,5	12,15	729,2	59	Nr. 162, (1951/28)	—	83	3,1	9,79	479,7	48
<i>sol</i> × <i>RB</i> .	Nr. 152, 79/55	100	100	0	0	0	59	Nr. 163, 130/25	100	27	0,9	0,84	50,4	59
<i>sol</i> × <i>Ra</i> . .	Nr. 153, 78/12	100	83	2,7	7,11	427,1	59	Nr. 164, 128/35	54	71	1,2	1,59	70,7	59
	Nr. 154, 77/44	41	25	3,7	13,85	831,5	59	Nr. 165, 128/1	28	41	1,1	1,18	93,5	58
	Nr. 155, 77/17	1	15	1,8	3,57	15,2	58							
<i>sol</i> × <i>Rt</i> . .	Nr. 156, 76/39	100	99	0,7	0,56	33,5	59	Nr. 166, 126/6	100	34	1,8	3,41	163,4	48
<i>cy</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 157, 71/5	100	93	1,6	2,54	154,4	59	Nr. 167, (1951/25)	—	58	4,1	16,14	726,3	44
	Nr. 158, 75/12	100	23	3,1	9,35	545,9	59	Nr. 168, 129/14	100	60	2,3	5,48	328,9	59
<i>RB</i> × <i>sol</i> .								Nr. 168, 129/59	18	50	1,8	3,28	196,9	59
<i>Ra</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 159, 73/36	100	50	4,8	23,99	1439,7	59	Nr. 170, 127/11	100	54	1,3	1,40	84,5	59
	Nr. 160, 74/6	0	5	0,4	0,21	12,7	59	Nr. 171, 127/19	5	41	1,5	2,28	137,0	59
<i>Rt</i> × <i>sol</i> . .	Nr. 161, 72/27	100	55	4,7	22,0	1320,1	59	Nr. 172, 125/5	100	55	1,7	2,88	173,2	59
								Nr. 173, 125/6	7	50	1,3	1,91	114,7	59

Elter diese vorerst noch hypothetischen Vorstellungen endgültig festigen kann.

4. Zweite bis fünfte Rückkreuzungsgeneration mit dem väterlichen Elter

Die nun folgenden Rückkreuzungen der nächsten Jahre wurden jeweils von mehreren Pflanzen mit bekanntem Sterilitätswert genommen. Bestünde eine einfache Relation zwischen Genom und Plasmon, so wäre zu erwarten, daß bei steigender Homozygotie im fremden Plasma entweder 100%ige Pollensterilität zustande kommt, oder mindestens eine konstant eingehaltene hohe Zahl. Außerdem sollte die Variationsbreite gleichbleiben oder wenigstens langsam abnehmen. Das Ansteigen der Homozygotie versuchten wir dadurch zu beschleunigen, daß wir als Kreuzungsweibchen in der ersten Gruppe mit dem *solenanthus*-Plasma jeweils die Pflanzen aussuchten, die am *cyaneus*- bzw. *Rexii*-ähnlichsten waren, und in der anderen mit dem *cyaneus*- bzw. *Rexii*-Plasma diejenigen, die am *solenanthus*-ähnlichsten waren. Zu einem Absinken der Sterilität kann es kommen, wenn man Pflanzen mit Mischplasma als Kreuzungsweibchen verwendet. In diesem Fall kann die Variationsbreite zunächst

auch zunehmen, das Fertilverhalten muß quantitativ um so häufiger in Erscheinung treten, je häufiger ein Plasmaübertritt stattgefunden haben kann, d. h. je öfter rückgekreuzt wurde. Aber es muß qualitativ um so stärker einsetzen, je größer die genische Homozygotie ist. Ausdruck dafür ist eine geringe Varianz. In den Tabellen 6 und 7 sind die Ergebnisse der folgenden Rückkreuzungen zusammengestellt. Von der R_2 ab sind von mehreren Kombinationen 2 Rückkreuzungsnachkommenschaften aufgezogen und ausgezählt worden, und in den folgenden Jahren haben wir uns bemüht, in der Kombination *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) und reziprok eine sterile und eine fertile Linie zu verfolgen. In der R_3 von *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) versuchten wir die Selektion einer sterilen aus einer fertilen Linie, wie die Zählung in der R_4 genauer zeigt.

Die gleichhohe oder eine höhere Sterilität und ein Gleichbleiben oder Abnehmen der Varianz in der R_2 ist bei der Nr. 128, *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) $\times$ *cy* $\times$ *cy*, bei Nr. 130, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii type*) $\times$ *Rt* $\times$ *Rt*, ferner bei Nr. 134, *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* und bei Nr. 139, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* zu finden. Bei Nr. 135, *Str. (Rexii Basel* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* liegt der Mittelwert der Pollensterilität wenig unter dem der R_1 , aber die Varianz ist gesichert größer als in der R_1 . Bei den Nr. 131, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* und Nr. 137, *Str. (Rexii albus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* liegen die Mittelwerte der Sterilität tiefer als in der R_1 . Die Differenzen sind gut gesichert ($P < 0,01$). Bei Nr. 137 ist außerdem die Varianz gesichert größer. Die Kreuzungsnachkommenschaften der fertileren Mutterpflanzen sind alle gesichert fertiler, bis auf Nr. 138, *Str. (Rexii albus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol*. Hier beträgt die Differenz zwar 11, aber bei Nr. 137 der Nachkommenschaft einer sterileren Pflanze derselben R_1 findet sich eine außerordentlich hohe Varianz, die gesichert größer ist als die der fertilen Linie. Ferner ist bemerkenswert, daß die Kreuzungsweibchen für die Nachkommenschaft Nr. 135, *Str. (Rexii Basel* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* und Nr. 136 mit einem Kreuzungsweibchen aus derselben R_1 sich so gut wie gar nicht unterscheiden. Aber ihre Nachkommenschaften sind deutlich verschieden. Ebenso ist es bei den Nr. 139 und 140. Dort hat außerdem die fertile Linie, deren Mittelwert bei 60% liegt, auch noch die signifikant größere Varianz ($P < 0,01$). Die fertilsten Linie, Nr. 132, deren Mittelwert $13 \pm 1,8$ beträgt, läßt eine auffallend niedrige Varianz bemerken, die sich gesichert von der sterilen Linie unterscheidet.

Wir wenden uns nunmehr der R_3 zu (vgl. ebenfalls Tabelle 6). Hier fallen durch hohe Sterilität und geringe Varianz der Einzelergebnisse 2 Kombinationen auf, nämlich Nr. 142, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii Basel*) $\times$ *RB* $\times$ *RB* $\times$ *RB*, und Nr. 146, *Str. (cyaneus* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* $\times$ *sol*. Wir haben es also wohl mit Nachkommenschaften zu tun, bei denen eine weitgehende Homozygotie besteht. Eine höhere Sterilität als in der F_1 findet sich noch bei Nr. 141, *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) $\times$ *cy* $\times$ *cy* $\times$ *cy* ($P < 0,02$ und $> 0,01$), ferner bei Nr. 143, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* ($P = 0,001$) und bei Nr. 145, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii type*) $\times$ *Rt* $\times$ *Rt* $\times$ *Rt* ($P = 0,001$). Der Mittelwert der Sterilität in der Rückkreuzungspopulation unterscheidet sich nicht mehr von dem der F_1 bei Nr. 151, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus*) $\times$ *sol* $\times$ *sol* $\times$ *sol* ($P = 0,1$). Der Mittelwert der Sterilität liegt gesichert niedriger bei

folgenden Kombinationen: Einmal bei Nr. 147, *Str. (Rexii Basel × solenanthus) × sol × sol × sol* ($P=0,001$) und außerdem bei Nr. 148, *Str. (Rexii albus × solenanthus) × sol × sol × sol* ($P<0,01$). Die hohen Varianzen in der R_1 und R_2 bei diesen beiden Kreuzungen ließen ein Absinken der Sterilität durchaus erwarten.

Ein schönes Beispiel für Verminderung der Varianz bei stärkerem Fertilwerden bietet Nr. 149, *Str. (Rexii albus × solenanthus) × sol × sol × sol*. Die Sterilität der Mutterpflanze betrug 23%, der Mittelwert der Rückkreuzung $8\% \pm 1,2$, Varianz der R_2 804,5; der der R_3 89,7. $P<0,001$. Anders verhält

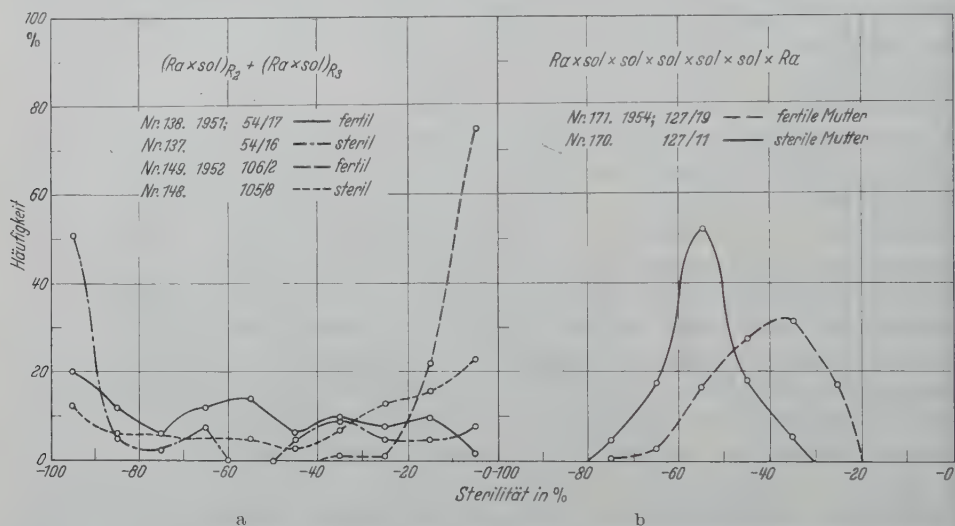


Abb. 5a u. b. Verteilung der Sterilitätstypen nach Klassen, die sich um 10% unterscheiden. a *Str. (Rexii albus × solenanthus) R₂ und R₃*. b *Str. (Rexii albus × solenanthus) R₄ × Rexii albus*. b zeigt deutlich, daß die Verteilung der Typen wieder eine annähernde Normalverteilung ist

sich die sterile Linie der reziproken Kreuzung Nr. 133, *Str. (solenanthus × Rexii albus) × Ra × Ra × Ra*. Obwohl sich die Mittelwerte der Sterilität nicht unterscheiden, ist die Varianz der R_3 größer als die der R_2 ($P=0,001$). In der Abb. 5 ist der Übergang von einer sterilen zu einer fertilen Nachkommenschaft und von einer fertileren in eine stark fertile graphisch an Hand der Verteilung der Typen in R_1 und R_2 dargestellt.

Die R_4 bietet nicht mehr viel Neues. Durchaus steril sind wieder die Rückkreuzungen Nr. 152, *Str. (solenanthus × Rexii Basel) × RB × RB × RB × RB*, ferner Nr. 156, *Str. (solenanthus × Rexii type) × Rt × Rt × Rt × Rt*, und endlich Nr. 157, *Str. (cyaneus × solenanthus) × sol × sol × sol × sol*. Nr. 153, *Str. (solenanthus × Rexii albus) × Ra × Ra × Ra × Ra* ist steriler geworden; unverändert und ziemlich fertilgeblieben ist Nr. 158, *Str. (Rexii Basel × solenanthus) × sol × sol × sol × sol*, Nr. 159, *Str. (Rexii albus × solenanthus) × sol × sol × sol × sol* und Nr. 161, *Str. (Rexii type × solenanthus) × sol × sol × sol × sol*. Ein wenig mehr nach dem Fertilen hin geht Nr. 151, *Str. (solenanthus × cyaneus) × cy × cy × cy × cy*. Die schon in der R_3 fertilen Linien Nr. 155, *Str. (solenanthus × Rexii albus) × Ra × Ra × Ra × Ra* und Nr. 160, *Str. (Rexii albus × solenanthus) × sol × sol × sol × sol* haben ihre Varianz noch

beträchtlich vermindert. Es hat also die Zahl der vollfertilen Typen darin zugenommen. Recht bemerkenswert ist freilich die Tatsache, daß es möglich war, aus der fertilen R_3 Nr. 144, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) $\times$ *Ra* $\times$ *Ra* eine sterilere Nachkommenschaft herauszuholen, deren Varianz wieder sehr groß ist. Es ist das die R_4 Nr. 154, mit einem Mittelwert von $25\% \pm 3,7$. Die Varianz ist gegenüber der R_3 nahezu um das Doppelte erhöht. In den beiden Generationen, der R_3 und der R_4 , zeichnet sich eine stärkere Tendenz zur ansteigenden Fertilität bei den Rückkreuzungen der *Rexii*-Rassen mit *solenanthus* und den Rückkreuzungen von *solenanthus* mit *cyaneus* ab. Zusammenfassend ist zur R_3 und R_4 nun noch folgendes hinzuzufügen: Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß sie sich nur dann verständlich machen lassen, wenn man annimmt, daß zu den bisherigen Bestimmungselementen der Pollensterilität noch ein weiteres hinzukommt. Es muß angenommen werden, daß mindestens in einige Kreuzungen eine Übertragung des Plasmons durch den Pollenschlauch zustande kommen kann, so daß die daraus erwachsenden Pflanzen ein Mischplasma besitzen. Anders wäre es nicht denkbar, daß eine einmal eingeschlagene Selektionsrichtung wieder rückwärts orientiert werden kann, daß also aus fertileren Formen durch Rückkreuzung sterilere Nachkommen herausgeholt werden können und umgekehrt. Da die R_5 keine prinzipiell neuen Resultate mehr ergab, haben wir sie, obwohl sie bearbeitet wurde, hier weggelassen.

5. Rückkreuzung der R_4 mit dem mütterlichen Elter als Vater

Was die Ergebnisse der Kreuzungen der R_4 mit der Mutter anlangt, und zwar mit der Mutter als väterlichem Elter, so keimten leider die Samen der Kreuzung *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus*) $R_4 \times cyaneus$ nicht. Zur Frage nach der Schmalblättrigkeit wurde 1952 eine Rückkreuzung der F_1 mit der Mutter jetzt als väterlichem Elter aufgezogen. Sie sind im Grunde genommen in diesem Zusammenhang uninteressant¹; wie sich diese ihre besondere Eigenschaft kennzeichnet, ist aus Tabelle 7 ersichtlich. Von den anderen Kombinationen wurden, wenn möglich, die Rückkreuzungen einer fertilen und einer sterilen Pflanze aufgezogen und durchgezählt. In allen diesen Fällen sind die Rückkreuzungen der fertilen Pflanzen stets, wie erwartet, fertiler als die der sterilen Pflanzen. In allen Populationen sind außerdem die Verteilungen der Typen wieder annähernde Normalverteilungen wie in Abb. 5. Sie sind also in dieser Beziehung der F_1 durchaus ähnlich.

Nun die Mittelwerte dieser Kreuzungen in ihrem Verhalten zu dem entsprechenden der F_1 -Generationen. Dabei nehmen wir am besten wieder voraus, was wir theoretisch zu erwarten haben unter der Annahme einer genischen und plasmonischen Bedingtheit der Pollensterilität. Sofern von derselben R_4 sterile und fertile Pflanzen mit der Mutter rückgekreuzt worden sind, sollten die Nachkommen der sterilen Pflanzen mit der Sterilität der F_1 übereinstimmen und eine entsprechend geringe Varianz haben. Sie könnten allenfalls noch etwas steriler sein als die F_1 . Die Rückkreuzungskombinationen der fertilen Pflanzen mit der

¹ Sie stellten eine R_1 im eigenen Plasma dar; es könnte also höhere Fertilität als in der R_1 im fremden Plasma erwartet werden, so wie das bei $(cy \times sol) \times cy$ auch der Fall ist. Doch ist das bei $(sol \times cy) \times sol$ nicht so. Diese Kombination ist steriler als $(sol \times cy) \times cy$ und besitzt auch eine höhere Varianz.

Mutter müßten aus Individuen zusammengesetzt sein, die fertiler sind als die reziproke F_1 , aber nicht vollfertil. Sie müßten jedenfalls eine Varianz wie die F_1 haben. Die Rückkreuzungen ganz besonders stark fertiler Pflanzen müßten gleich der reziproken F_1 oder ein wenig steriler sein. Ausnahmen von diesem Verhalten können wiederum nur durch Plasmaübertritt erklärt werden.

Diese Erwartung ist besonders gut für Nr. 170 und 171 in Tabelle 7 eingetreten. Nr. 170, die Nachkommenschaft einer 100%ig sterilen Pflanze, ist gleich der F_1 , wie auf Tabelle 5, Nr. 105 zu ersehen ist. Nr. 171, die Nachkommenschaft einer 5%ig sterilen Pflanze, ist fertiler als die reziproke F_1 Nr. 140, Tabelle 5. In der reziproken Serie, d. h. also *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii albus*) $R_4 \times solenanthus$ in den entsprechenden Rückkreuzungen, sind nicht solche Extreme verwirklicht. Ein Unterschied ist hier nicht zwischen 100%iger Sterilität und nahezu Fertilität, sondern zwischen 54%iger und 28%iger Sterilität. Darin ist nun Nr. 164 steriler als die F_1 , Nr. 165 jedoch fertiler als die reziproke F_1 und gleicht absolut derjenigen der reziproken R_4 fertil $\times$ Mutter, also der reziproken Nr. 171. Nr. 168, (*Str. Rexii Basel* $\times$ *solenanthus*) R_4 steril $\times$ *Rexii Basel* ist praktisch gleich der F_1 Nr. 103, Tabelle 5. Die andere, die fertile Form *Str. (Rexii Basel* $\times$ *solenanthus*) R_4 fertil $\times$ *Rexii Basel* ist gleich der F_1 Nr. 102, Tabelle 5. Die reziproke Kreuzung Nr. 163 *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii Basel*) R_4 steril $\times$ *solenanthus*, deren Kreuzungsweibchen aus einer total sterilen Population stammt, ist erstaunlicherweise höchst fertil. Nr. 172, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus*) R_4 steril $\times$ *Rexii type* ist steriler als die F_1 . Nr. 173, *Str. (Rexii type* $\times$ *solenanthus*) R_4 fertil $\times$ *Rexii type* ist ebenfalls steriler als die reziproke F_1 . Auch Nr. 166, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii type*) R_4 steril $\times$ *solenanthus* ist steriler als die F_1 , wenn auch nur wenig. Im großen und ganzen ist unser Material also durchaus den Erwartungen entsprechend, und die Ausnahmen davon sind wiederum nur allein durch Plasmaübertritt erklärbar.

6. Die Variabilität der Sterilität bei den Einzelpflanzen

Im folgenden ist es notwendig, auf diese Frage noch einmal genauer einzugehen, denn sie ist wichtig für die Beurteilung der Gesamtergebnisse und für manche nicht ganz klaren Beziehungen, die zwischen den einzelnen Generationen bestehen. Es wird sich nämlich dabei zeigen, wie schwierig die Selektion der sterilen Pflanzen ist und wie schwer sich unter Umständen die einzelnen Typen klassifizieren lassen. 1952 fiel in den einzelnen Auszählungslisten auf, daß die sterilen Pflanzen in einzelnen Nachkommenschaften unter den zuerst gezählten Gruppen häufiger waren als unter denen, die erst später aufblühten und dementsprechend später gezählt wurden, hier also eine höhere Einzelpflanzennummer erhielten. In der F_1 war schon ein Absinken der Sterilität mit der Dauer der Blühperiode festgestellt worden. Genau das Umgekehrte¹ war früher schon ein-

¹ Dabei sei darauf aufmerksam gemacht, daß die *Str. solenanthus*-Kreuzungen keineswegs die einzigen sind, in denen Pollensterilität festgestellt wurde, sondern diese ist häufig und weit verbreitet in den Bastarden der Gattung *Streptocarpus*. Daß wir hier die *Str. solenanthus*-Kreuzungen als Paradigma verwendet haben, liegt allein daran, daß es sich dabei um einjährige Pflanzen handelt, auch bei den unifoliaten, während die unifoliolate *Str. grandis* ausgesprochen zweijährig ist und es somit unmöglich ist, eine längere Generationsfolge davon zu bearbeiten.

mal bei OEHLKERS (1938, S. 337) festgestellt worden. Hier handelte es sich um den Bastard *Str. (grandis* $\times$ *Rexii* Lindl.) und reziprok. In beiden reziproken, unter denen kaum ein Unterschied in der Sterilität der Pollenkörner festzustellen war, zeigte sich eine eklatante Zunahme der Sterilität mit dem Alter der Pflanzen. Aus diesem Grunde wurde 1952 (vgl. Tabelle 8) von Nr. 135 und 139 eine

Tabelle 8. Doppelte Zählungen einzelner Pflanzen. Nr. 135 und 139 im Jahr 1952, Nr. 148 im Jahr 1953

	M	m ²	σ^2	FG	Vergleich
Nr. 135, 55/16 (<i>RB</i> $\times$ <i>sol</i>) $\times$ <i>sol</i> $\times$ <i>sol</i> I	91 $\pm$ 3,1	10,23	387,7	37	$D \dots 31 \quad t = 5,3$
II	60 $\pm$ 4,8	23,74	905,1	37	$P < 0,001$
Nr. 139, 51/17 (<i>Rt</i> $\times$ <i>sol</i>) $\times$ <i>sol</i> $\times$ <i>sol</i> I	97 $\pm$ 5,5	30,24	302,4	9	$D = 18 \quad t = 1,7$
II	79 $\pm$ 8,9	79,53	795,3	9	$P = 0,1$
Nr. 148, 105/8 (<i>Ra</i> $\times$ <i>sol</i>) $\times$ <i>sol</i> $\times$ <i>sol</i> I	41 $\pm$ 4,4	19,84	1178,5	59	$D = 13 \quad t = 2,0$
$\times$ <i>sol</i> II	54 $\pm$ 4,3	18,76	1125,8	59	$P < 0,05 > 0,02$

Reihe von Pflanzen zum zweitenmal durchgezählt, und dasselbe geschah mit einer R₃ Nr. 148 im Jahre 1953. Dabei ließ sich feststellen, daß es sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der Sterilität geben kann. Pflanzen, die zunächst vollkommen sterile Blüten hatten, brachten später fertile hervor, und auch das Umgekehrte konnte der Fall sein.

1953 und 1954 wurden an einzelnen Pflanzen möglichst viele Blüten durchgezählt, und dabei von jeder Blüte die Stellung an der Infloreszenz vermerkt, sowie der Tag der Zählung. Starke Schwankungen an Einzelpflanzen bemerkten wir hauptsächlich bei den Rückkreuzungen mit *Str. solenanthus*. Diese Bastarde sind ja ungemein reichblütig im Gegensatz zu den Rückkreuzungen mit den *Rexii*-Rassen und denen mit *Str. cyaneus*, bei denen es zuweilen mühsam war, nur 4 Blüten je Pflanze in einigermaßen kurzer Zeit hintereinander zu bekommen. Aus diesen Sterilitätsbildern der Einzelpflanzen kann man entnehmen, daß sie sich wirklich sehr unterschiedlich verhalten. Einige sind längere Zeit, einige

Tabelle 9. Vier Nachkommenschaften ein und desselben Kreuzungsweibchens von Blüten verschiedener Sterilität

	M	m ²	σ^2	FG
Nr. 174, 1953; 91/8 <i>Str. (Rt</i> $\times$ <i>sol</i>) $\times$ <i>sol</i> $\times$ <i>sol</i> $\times$ <i>sol</i> Aufzuchtjahr 1954				
1. Infloreszenz 26. Blüte, 90%	54 $\pm$ 5,0	25,35	807,2	39
2. Infloreszenz 25. Blüte, 90%	27 $\pm$ 4,8	22,63	905,5	39
3. Infloreszenz 20. Blüte, 60%	49 $\pm$ 5,8	34,03	1361,1	39
4. Infloreszenz 16. Blüte, 54%	57 $\pm$ 4,9	23,89	955,9	39

kürzere hindurch steril, und wiederum andere sind fertiler und haben zwischendurch auch gelegentlich sterile Blüten. Eine Abhängigkeit dieser Variabilität vom Wetter konnte nicht konstatiert werden. Nun taucht natürlich die Frage auf, wie verhalten sich Rückkreuzungen des gleichen Kreuzungsweibchens, jedoch von Blüten von verschieden starker Sterilität? Vier Nachkommenschaften sind bewältigt worden und in Tabelle 9 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß sich die 4 Nachkommenschaften durchaus etwas unterscheiden. Doch stehen

diese Unterschiede in keinem Zusammenhang mit der Sterilität der Blüte des Kreuzungsweibchens. Alle aber haben eine hohe Varianz. Aus diesen Ergebnissen geht also allein hervor, daß das Merkmal der Pollensterilität stark variiert. Die wahrscheinlichste Interpretation ist die einer Umkombination der plasmonischen Partikel. „*solenanthus*“ scheint also bei Rückkreuzung schneller homozygot zu werden, was im Mischplasma andererseits einen sehr plötzlichen Umschlag zur Fertilität zur Folge haben muß. Dieser Effekt tritt in den Auszählungen der Einzelpflanzen deutlich zutage.

D. Diskussion und Ergebnisse

Für die Diskussion der Ergebnisse, die nicht sehr umfangreich zu sein braucht, ist vor allen Dingen darauf hinzuweisen, daß die experimentellen Befunde und die daraus zu folgernden Schlüsse schon an verschiedenen anderen Objekten erhoben wurden. Gerade das Merkmal der Pollensterilität ist in umfassender Weise Gegenstand von Untersuchungen gewesen, die sich mit plasmatischer Vererbung beschäftigten. So hat vor allem MICHAELIS (1933—1948) seine *Epilobium* (*luteum* $\times$ *hirsutum*)-Bastarde besonders sorgfältig in der Beziehung ausgewertet. Und in Amerika ist ebenfalls im Anschluß an die Arbeiten RHOADES mit *Zea mays* darüber gearbeitet worden. Trotzdem lagen gute Gründe dafür vor, die mühevollen und umfangreiche Untersuchung auf *Streptocarpus* zu erweitern.

1. Die genische und plasmonische Bedingtheit der Pollensterilität bei den *Streptocarpus*-Kreuzungen

Bei den Kreuzungen zwischen *Str. solenanthus* einerseits, *cyaneus* sowie verschiedenen *Rexii*-Formen andererseits zeigt zunächst die F_1 eine nicht vollständige Pollensterilität mit geringer, aber signifikanter reziproker Verschiedenheit; überall dort, wo *Str. solenanthus* Mutter ist, wird die Pollensterilität in den ersten Rückkreuzungsgenerationen schwächer ausgeprägt als in der reziproken Kreuzung. Später werden gerade diese Kombinationen sehr einheitlich stark steril, während sich im *Rexii*-Plasma eine Verminderung der Sterilität fast nicht vermeiden läßt. Die erste Aufgabe bestand darin, das Vorhandensein einer genischen Grundlage nachzuweisen. Die F_1 , die Kombination mit der größtmöglichen Heterozygotie, dennoch weitgehend uniform, zeigt entsprechend geringe Varianz. Die F_2 und die R_1 dagegen zeigen eine erheblich erhöhte Varianz. Das bedeutet, daß hier eine Umkombination erheblichen Ausmaßes vorkommt, also eine genische Grundlage für das Phänomen der Pollensterilität vorhanden ist. Nun muß freilich im Durchschnitt ja bereits die F_2 bzw. die R_1 in höherem Grade homozygotisch sein als die F_1 . Wäre also eine rein genische Bedingtheit der Pollensterilität vorhanden, so müßte sie mit zunehmender Homozygotie absinken. Doch trifft das nicht zu. Vielmehr kann die Sterilität gegenüber der F_1 sowohl abnehmen als auch zunehmen. Das bedeutet, daß noch ein anderes genetisches Element mit im Spiele ist außer dem Genom, und das kann nur das Plasmon sein.

Indessen ergibt sich keine einfache Relation zwischen genischer und plasmonischer Bestimmtheit. Wäre das der Fall, dann müßte mit zunehmenden Rückkreuzungen und dem Homozygotischwerden des fremden Genoms im fremden

Plasmon 100%ige Pollensterilität gleichmäßig auftreten oder zum mindesten ein konstant eingehaltener relativ hoher Prozentsatz. Das ist aber keineswegs der Fall, vielmehr finden sich immer wieder von neuem in den einzelnen Rückkreuzungsgenerationen alle möglichen Zahlen, und auch die Möglichkeit der Selektion steriler aus fertilen Formen und umgekehrt. Gewiß ist das Merkmal sehr labil in seiner Ausprägung; sofern es sich aber um einfache Manifestationschwankungen handeln würde, müßten die Ausschläge der Penetranz stets dieselben bleiben. Das ist aber nicht der Fall. So bleibt nur noch die Möglichkeit offen, daß es sich bei verschiedenen Rückkreuzungsgenerationen um Entmischung von Mischplasmonpartikeln handelt.

In den späteren Generationen stellt sich aber zudem die Frage, ob mit dem *solenanthus*-Pollen häufiger Plasma übertragen wird als mit dem *Rexii*-Pollen, oder ob der Entwicklungsablauf in den *solenanthus*-ähnlichen Pflanzen nur eine größere Möglichkeit zur Umkombination der Plasmonpartikel bietet, so daß hier Fertilität häufiger manifest werden kann. Unser Material allein läßt über die Häufigkeit der Plasmaübertragung keinen Schluß zu. Denn das häufigere Fertilverwerden im *Rexii*-Plasmon kann ebensogut in der Entwicklungsgeschichte dieses Pflanzentypus begründet liegen, wie auch durch die andere Gen-Plasmon-Relation hervorgerufen sein.

MICHAELIS hat bei seinem *Epilobium*-Bastard ganz analoge Befunde gemacht; seine aufeinanderfolgenden Interpretationen sind indessen oftmals widerspruchsvoll. In der Tat ist es ja auch sehr schwierig, von einer einzigen Kreuzung aus Klarheit zu gewinnen. Darum ist die Unterstützung durch die zahlreicheren *Streptocarpus*-Bastarde besonders wertvoll. Die plasmonisch bedingte Pollensterilität beim Mais ist kaum mit den hier gegebenen Verhältnissen in Übereinstimmung zu bringen. Vielmehr handelt es sich dabei (vgl. RHOADES 1955) um eine rein plasmonische Bedingtheit der Pollensterilität. Doch werden in einigen Rassen Gene gefunden, die sich nach der Meinung der amerikanischen Autoren als Subpressoren dieser rein plasmonischen Pollensterilität erweisen.

2. Pollensterilität und Geschlechtsbestimmung

Sieht man die Tabellen der Rückkreuzungen durch, so findet man zahlreiche Pflanzen, die eine Pollensterilität von 100% aufweisen. Sie sind also im männlichen Geschlecht vollständig steril; mit anderen Worten, es handelt sich im Grunde genommen dabei um durchaus weibliche Pflanzen. Nun haben die ersten *Streptocarpus*-Arbeiten (OEHLKERS 1938—1941) gezeigt, daß die Geschlechtsbestimmung bei diesem Objekt genisch und plasmonisch bedingt ist. Es war das ein Einbruch in die so überaus schwierige Frage nach der Geschlechtsbestimmung der Zwitterpflanzen, die ja meistens kreuzungsanalytisch überhaupt nicht angegangen werden kann, weil Zwitter $\times$ Zwitter stets wieder Zwitter ergibt. Bei *Streptocarpus* hatten sich zwei vollkommen distinkte Gruppen von Pflanzen auffinden lassen, einmal die Gruppe von *Str. Rexii* und verwandten Formen, die im Genom eine schwach männliche Tendenz und stark weibliche besitzen, im Plasmon dagegen umgekehrt eine stark männliche Tendenz und eine schwach weibliche. Demgegenüber steht die Gruppe *Str. Wendlandii* mit einer stark männlichen und schwach weiblichen Tendenz im Genom sowie mit

einer schwach männlichen und stark weiblichen Tendenz im Plasmon. Die Kreuzungen zwischen diesen beiden Gruppen ergeben folgendes Phänomen: die F_1 enthält reziproke Verschiedenheiten in dem Sinn, daß im Plasmon von *Str. Rexii* Formen entstehen, die ein fertiles Androeceum, aber ein in seiner Fertilität eingeschränktes Gynaeceum haben. Umgekehrt: im *Wendlandii*-Plasmon entstehen Formen, denen die Antheren fehlen, die anstatt dessen nur Staminodien besitzen, dagegen ein vollfertiles Gynaeceum haben. Die Ausprägungsstärke dieser beiden reziprok verschiedenen Eigentümlichkeiten ist nicht ganz identisch bei den beiden Bastarden. Am intensivsten ist die Abweichung von normalen Zwittern im *Wendlandii*-Plasmon ausgeprägt, also bei dem Bastard *Str. (Wendlandii × Rexii)*. Das zeigt sich insbesondere an der R_1 , bei der im Verhältnis von 1:1 Pflanzen auftreten, denen ebenso wie in der F_1 die Antheren fehlen, und andererseits solche, die ein vollkommen verweiblichtes Androeceum besitzen. Anstelle der Staminodien können hier Gebilde auftreten, die mit Narbenpapillen und Samenanlagen versehen sind, ja die schließlich auch die Ausbildung eines halben Fruchtknotens erreichen können. Wie bei allen plasmatisch bestimmten Merkmalen ist das hier gegebene auch ungemein labil in der Ausprägung. Der Gruppe von *Str. Rexii* gehören außerordentlich viele Formen an, derjenigen von *Wendlandii* bisher nur relativ wenige, nämlich *Str. Wendlandii* und *Comptonii*.

Es ist nun von ausschlaggebender Bedeutung, daß die plasmatisch bedingte Pollensterilität ganz offenbar nichts mit der Geschlechtsbestimmung zu tun hat, denn sie findet sich unter den Angehörigen der Gruppe *Rexii* — *Str. solenanthus* und *Rexii* sowie *cyaneus*. Alle diese haben gegenüber *Wendlandii* genau dasselbe Verhalten, nur ein wenig quantitativ verschieden. Alle besitzen ein schwaches männlich bestimmendes und stark weiblich bestimmendes Genom, sowie ein stark männlich bestimmendes und ein schwach weiblich bestimmendes Plasmon. Wir können also die 100%ige Pollensterilität auf keinen Fall mit dem Ausfall der Antheren vergleichen, die bei Kreuzung mit dem Angehörigen der *Str. Rexii*-Gruppe mit *Wendlandii* im *Wendlandii*-Plasmon zustande kommt, auch wenn in beiden Fällen rein weibliche Pflanzen erscheinen. Erst in diesem Zusammenhang erhalten die hier gegebenen neuen *Streptocarpus*-Untersuchungen ihre volle Tragweite.

Danach stellt sich die Differenzierungsweise der Sexualität bei *Streptocarpus* folgendermaßen dar. Als Grundlage findet sich in den verschiedenen Formen ein verschieden ausgewogenes Verhältnis zwischen Männlichkeit und Weiblichkeit im Genom und Plasmon zur Bestimmung der Zwitterigkeit vor. Dieses Verhältnis ist so angelegt, daß in den einzelnen Formen selbst immer Zwitterigkeit zustande kommt, den Stärkeverhältnissen der verschiedenen Tendenzen im Plasmon und Genom entsprechend. Differenzen und Abweichungen von den Zwitterigkeitsverhältnissen kommen nur beim Austausch fremder Genome und Plasmone zustande. Diese so gegebene Grundlage allgemeiner Bisexualität wird von weiteren genetischen Bestimmungseinheiten überlagert. Das ist an sich nicht weiter zu verwundern. Der Umfang der Differenzierung, der mit Ausbildung und Vollzug der Sexualität zusammenhängt, ist so umfassend, daß natürlich eine große Anzahl von Genen dafür maßgeblich sein müssen. In dem hier gegebenen Fall sind im einzelnen genauer diejenigen aufgezeigt worden, die bei bestimmten

Kreuzungen Pollensterilität zur Folge haben. Sie zeigen also positiv gewandt, daß die Ausbildung der Pollenkörner von einer ganzen Reihe von Erbinheiten genomatischer und plasmonischer Natur normalerweise gesteuert werden.

Noch eine weitere Folgerung läßt sich daraus ziehen, wenn man vor allen Dingen — was ja überhaupt das Interessante an *Streptocarpus* ist — die Analyse des Plasmons im Auge hat. Die Plasmonen von *Str. solenanthus*, *Str. Rexii* und *Str. cyaneus* sind hinsichtlich der Geschlechtsbestimmung gleich. Sie sind aber verschieden in bezug auf die Pollensterilität und die Beeinflussung der Gene, die die Ausbildung der Pollenkörner zur Folge haben. So kann man also natürlich nicht das Plasmon als Einheit auffassen, sondern es ist notwendig, verschieden zusammengesetzte Plasmonen vermutlich aus verschiedenen Plasmonpartikeln als gegeben anzunehmen.

Für ihre Mithilfe in den ersten Jahren haben wir Frl. Dr. G. LINNERT und Herrn Dr. I. DEUFEL herzlich zu danken, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die uns zuteil gewordene großzügige Unterstützung.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Der reziprok gleiche Effekt der Pollensterilität bei den F_1 -Bastarden aus den Kreuzungen *Str. (solenanthus* $\times$ *cyaneus)*, *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* Basel), *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* albus) und *Str. (solenanthus* $\times$ *Rexii* type) erweist sich als durch eine Disharmonie zwischen bestimmten Genkombinationen und Plasmonen bedingt, denn

a) die Pollensterilität ist zwischen den reziproken F_1 -Nachkommenschaften quantitativ gesichert verschieden,

b) die R_1 zeigt höhere Sterilität als die F_1 ; in einzelnen Linien läßt sich der Sterilitätsgrad der F_1 bis zur R_4 erhalten,

c) die Genkombination in der F_2 und R_1 läßt die Uniformität der F_1 verschwinden. Erst in der Rückkreuzung $R_4 \times$ Mutter tritt diese wieder auf,

d) die Rückkreuzung R_4 (steril) $\times$ Mutter kann zu der Sterilität der entsprechenden R_1 führen, die von R_4 (fertil) $\times$ Mutter zu derjenigen der reziproken R_1 oder stärkerer Fertilität.

2. a) Zuweilen führen die Rückkreuzungen auch zum *Fertilwerden* der Nachkommenschaften, was durch Plasmaübertritt durch den Pollenschlauch erklärbar ist.

b) Die Variabilität der Sterilität bei den Einzelpflanzen kann sowohl auf Manifestationsschwankungen des labilen Merkmals (F_1 !) beruhen, als auch darüber hinaus die Folge einer Umkombination von Mischplasmonpartikeln sein.

3. Das Plasmon besteht aus verschiedenen Plasmonpartikeln, denn die Ausbildung des funktionsfähigen Androeceums wird von einer ganzen Reihe von Erbinheiten genomatischer und plasmonischer Natur gesteuert.

a) Diese Pollensterilität kann also nicht mit dem Ausfall der Antheren in den Kreuzungen *Wendlandii* $\times$ *Rexii* verglichen werden, hat also nichts mit jener Geschlechtsbestimmung zu tun.

b) Es lassen sich außerdem in bezug auf die Pollensterilität verschiedene Plasmon-Genom-Wechselwirkungen unterscheiden (*Rexii-solenanthus*-Plasmon!).

Literatur

CASPARI, E.: Cytoplasmic inheritance. *Advanc. Genet.* **2**, 2—66 (1948). — GABELMANN, W. G.: Reproduction and distribution of the cytoplasmic factor for male sterility in maize. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **35**, 634—639 (1949). — JOSEPHSON, L. M., and M. T. JENKINS: Male sterility in corn hybrids. *J. Amer. Soc. Agron.* **40**, 267—274 (1948). — MICHAELIS, P.: Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an *Epilobium*. II. Die Bedeutung des Plasmas für die Pollenfertilität des *Epilobium luteum-hirsutum*-Bastardes. I. Teil. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **65**, 1—71 (1933a). — Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an *Epilobium*. II. Die Bedeutung des Plasmas für die Pollenfertilität des *Epilobium luteum-hirsutum*-Bastardes. II. Teil. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **65**, 353—411 (1933b). — Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an *Epilobium*. III. Zur Frage der Übertragung von Pollenschlauchplasma in die Eizelle und ihre Bedeutung für die Plasmavererbung. *Planta (Berl.)* **23**, 486—500 (1935). — Über die Konstanz des Plasmons. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **74**, 435—459 (1938). — MICHAELIS, P., u. D. BAKKER: Über reziprok verschiedene Sippenbastarde bei *Epilobium hirsutum*. VIII. Vergleichende Untersuchungen über das Plasmom mehrerer *Epilobium hirsutum*-Sippen, die bei reziproker Kreuzung Unterschiede der Pollenfertilität zeigen. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **82**, 384—414 (1948). — OEHLKERS, F.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindley III. Neue Ergebnisse über die Genetik von Wuchsgestalt und Geschlechtsbestimmung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **58**, 76—91 (1940). — Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindl. IV. Weitere Untersuchungen über Plasmavererbung und Geschlechtsbestimmung. *Z. Bot.* **37**, 158—182 (1941). — Faktorenanalytische Ergebnisse an Artbastarden. *Biol. Zbl.* **62**, 280—289 (1942). — Neue Überlegungen zum Problem der außerkaryotischen Vererbung. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **84**, 213—250 (1952). — RHOADES, M. M.: The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. *J. Genet.* **27**, 71—93 (1933). — The genetic control of mutability in maize. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **9**, 138—144 (1941). — Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **29**, 327—329 (1943). — Interaction of genic and non-genic hereditary units and the physiology of non-genic inheritance. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. I, S. 19—57. 1955. — SCHWARTZ, D.: The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of male sterility in maize. *Genetics* **36**, 676—696 (1951).

Professor Dr. FRIEDRICH OEHLKERS,
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.,
Schänzlestr. 9/11

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften
zu Berlin in Gatersleben

SOMATISCHE KONVERSION BEI *LYCOPERSICON*
ESCULENTUM MILL.*

Von

RUDOLF HAGEMANN

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Mai 1958)

Werden bei höheren Pflanzen mit Hilfe von Röntgenstrahlen Mutationen ausgelöst, so treten unter den entstehenden erblichen Varianten Chlorophyllmutanten besonders zahlreich auf. Die Häufigkeit ihres Erscheinens wird geradezu als Maß für die mutagene Wirkung von Bestrahlungen benutzt. Die „Chlorophyllmutanten“ stellen in ihrer Gesamtheit eine sehr heterogene Gruppe dar. Sie umfassen alle erblichen Veränderungen des Chlorophyllgehaltes, der Zahl oder Struktur der Chloroplasten, gleichgültig zunächst, ob sie durch Mutation im Genom oder Plasmon entstanden sind.

Chlorophyllmutanten werden zur Bearbeitung verschiedener biologischer Fragestellungen herangezogen. Die Biogenese der Chlorophylle, Probleme der Photosynthese, der Farbstoffgehalt der Chloroplasten, Entwicklung und Struktur der Plastiden und ähnliche Themen werden an ihnen untersucht. Außerdem verwendet man sie oft zu Studien allgemeiner genetischer und entwicklungsphysiologischer Fragen, weil der Chlorophylldefekt auch somatisch leicht erkennbar ist.

Die vorliegende Untersuchung¹ beschäftigt sich mit der Genetik der verschiedenen *sulfurea*-Allele, ihrer Entstehung und der Grün-Bleich-Scheckung der heterozygoten Pflanzen. Über die Struktur der normalen Chloroplasten der Tomate, ihre Entwicklung, die verschiedenen Abänderungsformen der Plastiden in bleichen Blattbezirken sowie die Eigentümlichkeiten der vorliegenden Scheckungen wird an anderer Stelle berichtet werden.

A. Die Entstehung der Mutante *sulfurea*

Nach Röntgenbestrahlung von Pflanzen der Tomatensorte Lukullus trat 1949 in dem Material von STUBBE unter 25 Pflanzen der X₂-Nummer 3564/49 eine gelbbunte Pflanze auf. In ihrer Nachkommenschaft befanden sich 1950 (H428/50) einige gelbgrüne Keimlinge. Sie waren die erstmalig aufgetretenen Homozygoten der Chlorophyllmutante *sulfurea* (*sulf*; s. unten). Von ihnen konnten Früchte geerntet werden. Die im folgenden Jahr aus ihren Samen entstandenen Keimlinge (I 237/51) waren verschieden stark gelbgrün gescheckt, mit allen Über-

* Unter Verwendung des genetischen Teils einer Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Math.-Naturwissensch. Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

¹ FrL. DOROTHEA FESSEL und FrL. GISELA HARTMANN bin ich für die Mithilfe bei den Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

gängen von kaum sichtbarem zu intensivem Gelb. Von den am stärksten gescheckten Pflanzen wurde geerntet. Aus den Samen entwickelten sich im Jahre 1952 Keimlinge (K 123/52), von denen 5 leuchtend gelbgrün und 12 mehr oder weniger gelbgrün marmoriert waren. Von den 5 Keimlingen mit den leuchtend gelbgrünen Kotyledonen gingen 3 ein. Die verbleibenden 14 Pflanzen hatten eine unterschiedliche Laubblattfärbung. Zehn Pflanzen waren gescheckt, wobei das Ausmaß der Scheckung alle Abstufungen von starker bis zu schwacher Marmorierung und Aufhellung umfaßte. Vier Individuen hatten grüne Laubblätter. Von allen Pflanzen wurde getrennt geerntet.

Im Jahre 1953 wurden die Nachkommenschaften geprüft (510—526/53). Alle Nachkommen der 10 gescheckten Pflanzen hatten Chlorophylldefekte. Im einzelnen waren die Kotyledonen von ungefähr 30% der Keimlinge gelb, von 40% gelbgrün gescheckt und von 30% verwaschen grün. Von den Nachkommenschaften der Pflanzen mit grünen Laubblättern waren zwei ebenfalls chlorophylldefekt. Die beiden anderen hatten fast normal grüne Kotyledonen und gelbgrün verwaschene Laubblätter.

Das Ausmaß der Laubblattscheckung bei diesen Pflanzen variierte wiederum außerordentlich. Es waren alle Abstufungen zu beobachten zwischen stark und nur schwach gescheckten Pflanzen, an denen sogar größere einheitlich grüne Partien vorkamen. An geeigneten Individuen wurden 1953 reziproke Kreuzungen mit der Ausgangssorte Lukullus¹ durchgeführt, und zwar Kreuzungen zwischen Lukullus einerseits und stark, mittelstark und schwach gescheckten Ästen der Mutanten andererseits.

Im Jahre 1954 wurde die F₁ dieser Kreuzungen angebaut. Die 21 F₁-Generationen bestanden aus Pflanzen mit normal grünen Keimblättern. In den heterozygoten (*sulf*⁺ *sulf*) Pflanzen war demnach das *sulfurea*-Allel in seiner Einwirkung auf die Keimblätter vollständig rezessiv. Später traten in allen Nummern an verschiedenen Pflanzen grün-bleich gescheckte Laubblätter auf, und zwar unabhängig davon, ob die Mutante Mutter oder Vater gewesen war.

Tabelle 1. Scheckungsprozente der Heterozygoten (1954)

Kreuzung	Gesamtzahl der F ₁ -Pflanzen	Zahl der gescheckten Pflanzen	Prozentanteil der gescheckten Pflanzen
I. Stark gescheckte Partien × Lukullus und reziprok	487	41	8,4
II. Mittelstark gescheckte Partien × Lukullus und reziprok	529	48	9,1
III. Schwach gescheckte Partien × Lukullus und reziprok	409	64	15,7
Gesamtsumme	1425	153	10,7

Eine positive Korrelation zwischen der Stärke der Laubblattscheckung von F₁-Linien und der Intensität in der Scheckung des mutierten Kreuzungselters war nicht festzustellen (s. Tabelle 1). Die aufgetretenen Unterschiede in den Scheckungsprozentsen liegen, wie die Ergebnisse des Jahres 1957 zeigen (s. Tabelle 8 und 9), innerhalb der Variabilitätsgrenzen.

¹ Eine genaue Beschreibung der Sorte Lukullus wurde von LEHMANN (1955) und STUBBE (1957) gegeben.

B. Die Kreuzungsnachkommenschaften

Die Nachkommenschaften der nichtgescheckten heterozygoten ($sulf^+sulf$) Pflanzen

Von der 1954 auf dem Feld angepflanzten F_1 wurde aus zwei Nummern von je 10 nichtgescheckten, normal grünen Formen geerntet. (Außerdem wurden Samen von gescheckten Pflanzen gewonnen; darüber wird weiter unten berichtet.) Alle F_2 -Generationen spalteten 1955 in der Keimblattfarbe im Verhältnis 3 grün:1 gelb (Tabelle 2). Damit war erwiesen, daß es sich bei der 1949 erstmals festgestellten Erbänderung um eine regelmäßig monogen spaltende, rezessive Blattfarbmuation handelt.

Der Mutante wurde der Name „*sulfurea*“ (schwefelgelb) und das Symbol „*sulf*“ gegeben. Sie gehört nach der von GUSTAFSSON (1940) vorgenommenen phänotypischen Gliederung der verschiedenen Chlorophyllmutanten in die *xantha*-Gruppe¹ (vgl. FREISLEBEN und LEIN 1943).

Die in den Keimschalen zu einem Viertel auftretenden homo-

zygoten *sulfurea*-Pflanzen sind zum ganz überwiegenden Teil nicht lebensfähig. Nach dem Aufgang sind ihre Keimblätter zunächst grünlich-gelb, im Verlauf einiger Tage werden sie schwefelgelb. Nach weiteren 10 Tagen sind die meisten Pflanzen gestorben. Nur einige wenige überleben. Genauere Einblicke in diese Vorgänge gewährten die an größerem Material durchgeführten Untersuchungen der Jahre 1956 und 1957 (s. Kapitel C).

Die Pflanzen, die aus den F_2 -Keimlingen mit grünen Kotyledonen entstanden, hatten zum größeren Teil normal grüne Laubblätter. Ein beträchtlicher Prozentsatz zeigte jedoch eine deutliche Grün-Bleich-Scheckung der Laubblätter. Geerntet wurde 1955 nur von normal grünen Pflanzen. Ihre im Jahre 1956 geprüften Nachkommenschaften verhielten sich verschieden. Ein Drittel der Pflanzen, die 1955 grüne Keimblätter hatten, war homozygot $sulf^+sulf^+$, d. h. normal. Ihre Nachkommen hatten grüne Kotyledonen, auch die Laubblätter waren normal grün. Die restlichen zwei Drittel der 1955 angebauten Pflanzen waren heterozygot $sulf^+sulf$. Von ihnen zeigte ein Teil Laubblattscheckung, ein anderer nicht. Die Nachkommenschaften der letzten Gruppe spalteten wie die F_2 -Generationen von 1955 in bezug auf die Keimblattfarbe im Verhältnis 3 grün:1 gelb (Tabelle 2). Genauso verhielten sich 1957 die Nachkommenschaften heterozygoter grüner Pflanzen des Jahres 1956 (Tabelle 2).

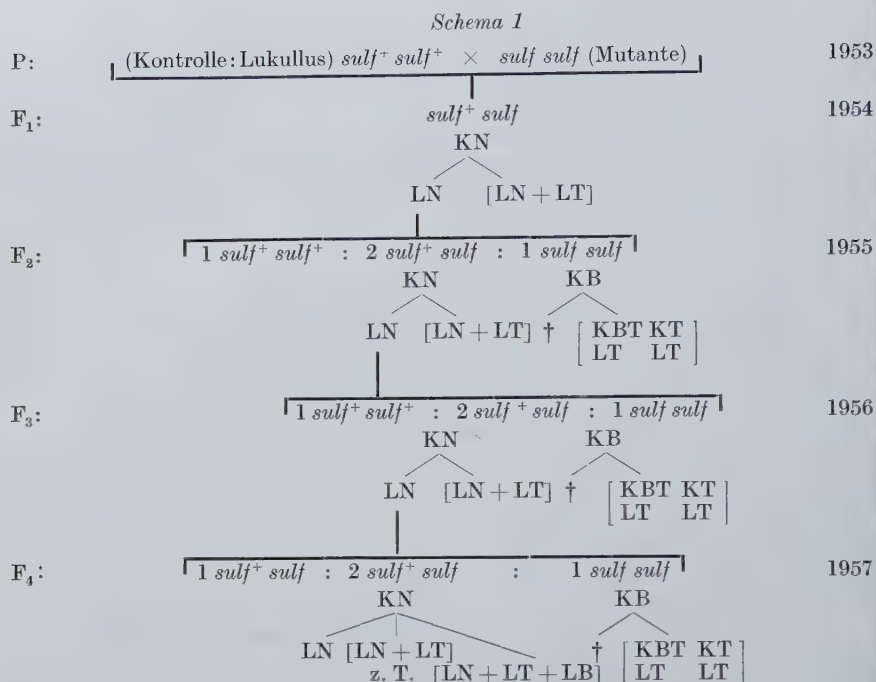
Die eben geschilderten Verhältnisse seien im Schema 1 zusammenfassend dargestellt. Das Verhalten der Nachkommenschaften gescheckter heterozygoter Pflanzen ist der Übersicht halber weggelassen worden.

¹ Mit der in Gatersleben außerdem vorhandenen, von Herrn Dipl.-Gärtner K. GRÖBER bearbeiteten Chlorophyllmutante *xantha* ist *sulfurea* nicht allel.

Tabelle 2. Spaltungsergebnisse in den Nachkommenschaften grüner heterozygoter Pflanzen

Jahr	Zahl der Nachkommenschaften	Pflanzen mit grünen Keimblättern (KN)	Pflanzen mit gelben Keimblättern (KBT + KB)	Spaltungs-verhältnis
1955	20	2071	693	2,99:1
1956	87	13447	4050	3,32:1
1957	107	12976	4079	3,18:1
		28494	8822	3,29:1*

* Das geringe Rezessivendefizit entsteht zum großen Teil durch die etwas herabgesetzte Keimfähigkeit der *sulfurea*-Homozygoten.



Die Nachkommenschaften der in [] gesetzten Pflanzen sind der Übersicht halber weggelassen (vgl. Text).

Abkürzungen: Keimblätter: grün KN; gelb KB; zunächst gelb, später gescheckt KBT; gescheckt KT. Laubblätter: grün LN; gelb LB; gescheckt LT. †: Pflanzen innerhalb von 14 Tagen abgestorben.

Die Nachkommenschaften der gescheckten heterozygoten ($sulf^+ sulf$) Pflanzen

Im Jahre 1954 wurde von drei gescheckten Pflanzen (664 A/54, 666 A/54, 701 A/54) geerntet, 1955 dagegen nur von grünen Formen. 1956 wurde umfangreiches Samenmaterial von gescheckten Pflanzen gewonnen (aus 22 Nummern von jeweils, wenn möglich, 10 Pflanzen).

In den Nachkommenschaften heterozygoter gescheckter Pflanzen ist das Spaltungsverhältnis von grün:gelb deutlich zugunsten der *sulfurea*-Homozygoten verschoben. Das Gesamtverhältnis betrug 1957 in den Nachkommenschaften grüner Heterozygoten 3,18:1 (Tabelle 2), bei den Nachkommen gescheckter Heterozygoten war es 1,81:1 (Tabelle 3). Die Durchsicht der Einzelwerte zeigte, daß von 143 Nachkommenschaften 85 normal 3:1 spalteten (s. Tabelle 3, Abteilung I; 3,15:1). In den übrigen 58 Nummern dagegen trat eine ausgeprägte Zunahme der nichtgrünen Keimlinge auf, die so stark werden konnte, daß grüne Pflanzen vollständig fehlten. Die 58 Nummern wurden weiter unterteilt. In der Abteilung II ist das Spaltungsverhältnis zwar kleiner als 3:1, aber noch größer als 1:1 (1,49:1). In der nächsten (Abteilung III) ist es kleiner als 1:1, grüne Keimlinge sind aber noch sicher vorhanden (0,49:1). Die Abteilung IV umfaßt Nachkommenschaften, in denen fast oder überhaupt keine grünen Pflanzen mehr auftreten (0,03:1).

Tabelle 3. Spaltungsergebnisse in den Nachkommenschaften gescheckter heterozygoter Pflanzen
Gesamtergebnis: 13888 grün:7659 gelb = 1,81:1

Abteilung I: Spaltungsverhältnis $\approx 3:1$

Zahl der Nachkommenschaften	Keimblätter		
	KN	KBT	KB
85	10396	: 189	: 3113
	10396	: 3302	
	3,15	: 1	

Abteilung II:
Spaltungsverhältnis $< 3:1$ und $> 1:1$

Nr. der Elternpflanze	Keimblätter		
	KN	KBT	KB
172 III 14	107	27	44
343 IV 17	109	35	57
149 II 6	122	43	53
149 III 12	134	19	64
149 IV 3	141	26	49
127 I 12	108	29	61
127 I 16	135	21	46
127 II 14	135	11	54
253 III 4	37	11	17
253 V 9	48	—	27
299 III 12	53	—	24
264 II 6	106	48	48
264 III 12	110	48	59
219 I 1	144	16	61
219 I 8	29	—	14
219 II 6	36	—	19
219 V 13	42	9	19
101 I 10	46	3	19
150 I 11	122	29	64
150 II 8	39	4	12
150 IV 1	141	17	59
179 I 7	102	36	66
179 I 13	131	31	59
241 II 17	39	16	9

2216 : 479 : 1004
2216 : 1483
1,49 : 1

Abteilung III: Spaltungsverhältnis $< 1:1$

Nr. der Elternpflanze	Keimblätter		
	KN	KBT	KB
172 IV 17	103	45	60
343 III 3	13	25	10
343 III 4	49	93	62
343 III 12	56	46	44
343 V 8	98	80	51
149 I 11	82	67	58
127 III 18	28	77	102
127 IV 17	80	73	59
127 V 16	45	76	59
321 I 12	42	44	36
253 IV 15	15	23	12
299 IV 5	49	58	59
264 II 15	93	61	61
264 III 3	38	53	35
264 V 13	93	75	46
264 IV 18	28	40	73
219 I 18	5	13	8
219 II 4	25	62	34
219 III 3	43	29	21
219 V 15	12	20	20
354 V 1	15	32	20
179 IV 5	91	59	53
179 IV 18	52	38	33
179 IV 20	82	66	54
146 V 20	15	45	9
220 I 6	6	89	40
220 II 6 AT	7	41	15

1268 : 1430 : 1134
1268 : 2564
0,49 : 1

Abteilung IV: Grüne Keimblätter sind kaum noch oder überhaupt nicht mehr vorhanden

Nr. der Elternpflanze	Keimblätter:		
	KN	KBT	KB
321 II 8	2	13	36
150 I 10	3	14	49
220 I 15	—	31	20
354 B	3	31	116

8 : 89 : 221
8 : 310
0,026 : 1

In dieses 1957 gewonnene Bild fügen sich die Befunde des Jahres 1955 völlig ein. Sie wurden bei der Auswertung der Nachkommenschaften jener drei gescheckten Pflanzen (siehe oben) erhalten, von denen 1954 fruchtstandweise geerntet worden war (Tabelle 4). Auch hier wurden Vertreter aller vier Abteilungen gefunden. Zugleich kommt in Tabelle 4 ziemlich deutlich der Zusammenhang zwischen dem Scheckungsgrad des Ernteortes und den Abweichungen vom normalen 3:1 Spaltungsverhältnis zum Ausdruck, der im Kapitel D noch ausführlicher besprochen werden wird.

Tabelle 4. Die Nachkommenschaften gescheckter Pflanzen des Jahres 1954

Nr. 1954	Nr. 1955	KN	KB + KBT	Abteilungs- Nr. (s. Tab. 3)	Ernteort
664 A	844	110	31	I	normal grün
666 A	870	104	36	I	normal grün
666 A	872	112	36	I	normal grün
701 A	916	75	28	I	Kelchblätter grün
701 A	918	91	27	I	Kelchblätter grün
666 A	876	104	40	I (—II)	gescheckt
664 A	842	98	43	II	normal grün
666 A	874	47	33	II	gescheckt
701 A	920	13	86	III	1 grünes, 5 weißgrün gesprenkelte Blätter
664 A	846	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	gescheckt
664 A	848	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	gescheckt
701 A	922	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	Kelchblätter alle weißlichgrün gescheckt
701 A	924	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	Kelchblätter alle weißlichgrün gescheckt
701 A	926	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	Kelchblätter alle weißlichgrün gescheckt
701 A	928	—	nur KB(T)-Pflanzen	IV	Kelchblätter alle weißlichgrün gescheckt

C. Die homozygoten *sulfurea*-Mutanten¹

Eine Serie multipler Allele

In den Nachkommenschaften heterozygoter (*sulf*⁺*sulf*) Pflanzen spalten zu einem Viertel homozygote *sulfurea*-Keimlinge heraus (s. Schema 1). Ihre Kotyledonen sind kurz nach der Keimung gelb, z. T. mit einem grünlichen Anflug. Die Farbe wird im Laufe von 3—4 Tagen zu einem blassen Gelb (= *sulfurea*). In den folgenden Tagen zeigen sich auffällige Unterschiede zwischen den Keimlingen der einzelnen Linien, die auf verschiedene F₁-Pflanzen des Jahres 1954 zurückgehen. Diese Linien bilden 2 Gruppen.



Abb. 1. Homozygote *sulfurea*-Keimlinge. Links *sulfurea*; Die Kotyledonen sind rein gelb (KB); die Keimlinge von *sulfurea* sehen bald nach der Keimung ebenso aus. Rechts ein überlebender gescheckter Keimling von *sulfurea* (KBT)

Bei den Keimlingen der 1. Gruppe wird die blaßgelbe Farbe immer ausgeprägter. Der grünliche Ton verschwindet völlig (Abb. 1), und nach 5—10 Tagen beginnen die Kotyledonen, sich zu wellen. Alle Keimlinge sterben ab; oft vertrocknen sie von den Blatträndern her (Schema 1: KB—†). Die *sulfurea*-Allele dieser Linien wirken letal i. s. str. Durch Pfropfung auf Kontrollunterlagen können derartige *sulfurea*-Keimlinge am Leben erhalten werden.

Die *sulfurea*-Homozygoten der 2. Gruppe verhalten sich zum großen Teil wie die der eben geschilderten ersten, sie sterben ab. Bei einem anderen, geringeren

¹ Über die Ergebnisse der Kapitel C und D wurde bereits vorläufig berichtet (HAGEMANN, 1958).

Teil aber verstärkt sich im Laufe der ersten Tage der grüne Farbanflug. Die Kotyledonen beginnen entweder von der Blattspitze her oder gleichzeitig auf der gesamten Blattfläche zu ergrünen. Dabei tritt eine gleichmäßige Grünpunktierung des gesamten Keimblattes auf. Bei vielen Keimlingen reicht die Anzahl der grünen Blattzellen nicht aus, um ein Überleben zu ermöglichen. Anderen hingegen gelingt es. Bei ihnen hat im Laufe der ersten Tage der Anteil der grünen Blattbezirke stark zugenommen (Abb. 1). Die Pflanzen wachsen bedeutend langsamer als ihre grünen Konkurrenten, bilden aber nach längerer Zeit ebenfalls Laubblätter aus, die in verschiedenem Grade, meist sehr stark, gescheckt sind (Schema 1: KB—KBT—LT). Zum Teil bringen sie auch Früchte (s. unten). Die *sulfurea*-Allele dieser Linien wirken semital (HADORN 1949). Bei ganz wenigen Pflanzen ist der erste Teil der Entwicklung verkürzt; ihre Kotyledonen sind nach der Keimung bald grün punktiert. Im weiteren verhalten sich die Keimlinge den eben beschriebenen Pflanzen gegenüber völlig gleich, nur sind sie in den ersten Tagen etwas kräftiger (Schema 1: KT—LT). Die überlebenden *sulf*-Homozygoten sind genetisch und in ihrem Phänotyp den unter A geschilderten *sulfurea*-Mutanten der Jahre 1950—1953 gleich. Auch von den *sulfurea*-Keimlingen der 2. Gruppe wurden etliche auf Kontrollunterlagen gepfropft.

Die Zahl der überlebenden *sulfurea*-Homozygoten war in den Nachkommen-schaften gescheckter Heterozygoten, die abweichende Spaltungszahlen brachten (Tabelle 3), auffallend erhöht. Bei manchen Nummern, die viele KBT-Keimlinge (s. Schema 1) enthielten, ergab sich in der Keimblattfarbe ein fast fließender Übergang von Gelb zu Grün. Die weitere Entwicklung „unklarer“, d. h. fast grüner Pflanzen, das Aussehen ihrer Laubblätter und ihre Nachkommenschaft zeigten: Pflanzen, deren Keimblätter irgendeine, wenn auch noch so geringe Scheckung aufweisen, sind homozygot *sulf sulf*. Die Heterozygoten (*sulf⁺ sulf*) und die homozygot Grünen (*sulf⁻ sulf⁻*) haben vollständig grüne Kotyledonen.

Die Teilung der verschiedenen Linien in 2 Gruppen könnte bis zu einem gewissen Grade künstlich erscheinen. Es traten Saatnummern mit einem, zwei, drei und mehr Überlebenden auf, so daß ein fast kontinuierlicher Übergang vorhanden war. Der Pfropfungsversuch erlaubte jedoch eine klare Abgrenzung.

Die homozygoten *sulfurea*-Keimlinge wurden am Tage ihrer Keimung oder einen, höchstens zwei Tage danach auf etwa 1 Monat alte Lukullus- oder seltener Condine-Red-Unterlagen gepfropft. Die jungen Reiser sind sehr empfindlich, deshalb war der Ausfall ziemlich groß. Im Durchschnitt wuchsen 30% der gepfropften Pflänzchen an und entwickelten sich zu blüten- und fruchttragenden Pflanzfreisern.

Reiser, die aus einer Linie stammten, verhielten sich gleich. Dagegen traten zwischen den gepfropften Pflanzen verschiedener Linien Unterschiede auf. Während die Angehörigen der beiden oben geschilderten Gruppen unter sich einheitlich waren, differierten der Pflanzen, die nicht zur selben Gruppe gehörten, stark. Sie enthielten deutlich voneinander unterscheidbare Allele, die mit dem Normalfaktor *sulf⁺* eine Serie multipler Allele bilden.

1. Allelengruppe *sulfurea^{pura}* (*sulf^{pura}*). Die Keimblätter sind blaßgelb. Die Keimlinge sterben ab, wenn sie nicht gepfropft werden (Gruppe 1, s. oben). Gepfropfte Keimlinge wachsen zu Pflanzen heran, deren Blätter zunächst, vor allem bei nicht zu starker Belichtung, grünlichgelb sind. (Bei einzelnen Pfropfungen kann der grüne Farbton der jüngsten Blätter sogar ziemlich intensiv werden.) Später werden sie dann *rein* (= *pura*) *gelb* und bleiben während ihres ganzen

Lebens gelb (Abb. 2 und 3), bis sie, oft ziemlich zeitig, braun werden und abfallen.

In dem uns vorliegenden Material sind mehrere *sulf^{pura}*-Allele vorhanden. Zwar gleichen sich die homozygoten *sulf^{pura}*-Pflanzen verschiedener Linien im Keim-



Abb. 2. Pflanzungen junger homozygoter *sulfurea*-Pflanzen. Links *sulf^{pura}*: Die Laubblätter sind rein gelb (LB). Rechts *sulf^{vag}*: Die Laubblätter in verschiedenem Grade gelb-grün gescheckt (LT)



Abb. 3. Laubblätter gepfropfter *sulfurea*-Homozygoten. Links *sulf^{pura}*: rein gelb. Rechts *sulf^{vag}*: stark gelb-grün gescheckt

2. Allelengruppe *sulfurea^{variegata}* (*sulf^{vag}*). Ein großer Teil der Keimlinge stirbt wie bei *sulf^{pura}* ab. Einige jedoch überleben und wachsen zu gescheckten Pflanzen heran, die z. T. auch ohne Pfropfung zur Fruchtbildung kommen können (Gruppe 2, s. oben). Alle bisher gepfropften Keimlinge von *sulf^{vag}* entwickelten sich zu Pflanzen mit *gescheckten* (= *variegata*) Laubblättern (Abb. 2 und 3). Dabei kann der Grad der Scheckung, d. h. der Anteil der grünen und der bleichen Blattbezirke ziemlich stark variieren. („Bleich“ bezeichnet alle Farbnuancen jenseits des reinen Grün: Grünlichgelb, Gelb, Gelblichweiß und Weiß.) Mit zunehmendem Alter verändert sich bei den gepfropften *sulf^{vag}*-Homozygoten das Verhältnis von grünen zu bleichen Blattbezirken zugunsten der grünen. Die Scheckung der überlebenden, nichtgepfropften *sulf^{vag}*-Homo-

lingsstadium und nach Pfropfung völlig. Die einzelnen *sulf^{pura}*-Allele rufen jedoch mit ganz unterschiedlicher Stärke in den Heterozygoten

Laubblattscheckung hervor (vgl. Kapitel D) und zeigen damit, daß sie nicht identisch sind; *sulf^{pura}* bezeichnet eine Gruppe von Allelen mit gleichem Phänotyp der Homozygoten. Praktisch wurde so verfahren, daß jedes aus verschiedenen Linien gewonnene *sulf^{pura}*-Allel sowie später aufgetretene Abweicher mit *pura*-Verhalten als *sulf^{pura}¹*, *sulf^{pura}²* usw. bezeichnet wurden. Einige von ihnen werden identisch sein, andere sind sicher voneinander verschieden (s. Tabelle 5). Die von *sulf^{pura}*-Reisern geernteten Samen lieferten nur gelbe Keimlinge (s. Tabelle 6).

Tabelle 5. Die bisher isolierten sulfurea-Allele (*sulf^{pura}* und *sulf^{vag}*)

Allel-Bezeichnung	Nr. 1956	Nr. 1957	Konversionspotenz in Heterozygoten
<i>pura 1</i>	365	1) 145 150	schwach
<i>pura 2</i>	365	143	
<i>pura 3</i>	354	375	
<i>pura 4</i>	101	11) 13	stark
<i>pura 5</i>	343	173	
<i>pura 6</i>	238	447	stark
<i>pura 7</i>	127	223	mittel
<i>pura 8</i>	253	266	schwach
<i>pura 9</i>	264	301	mittel
<i>pura 10</i>	219	331	stark
<i>vag 1</i>	208	111) 25	sehr schwach
<i>vag 2</i>	332	121	
<i>vag 3</i>	150	414	mittel

Tabelle 6. Die Nachkommen von sulfurea-Homozygoten

Allel-Bezeichnung	Zahl der Nachkommenschaften	<i>sulf sulf</i> (KBT + KB)	Grüne Keimlinge (KN)
a) Nachkommenschaften gepfropfter <i>sulf</i> -Homozygoten von 1957			
<i>pura 1</i>	7	256	—
<i>pura 4</i>	4	288	—
<i>pura 4</i> × <i>pura 1</i>	1	27	—
<i>vag 1</i> × <i>pura 1</i>	1	10	—
<i>pura 1</i> × <i>vag 1</i>	1	31	—
<i>vag 1</i>	15	1157	—
b) Nachkommenschaften nichtgepfropfter <i>sulf^{vag}</i> -Homozygoten			
1957: <i>vag</i>	28	1040	—
1958: <i>vag</i>	6	535	—
<i>vag</i>	6	391	17

zygoten und die der gepfropften ist im Prinzip gleich. Im großen und ganzen (nicht in jedem Einzelfall!) scheint der Anteil der grünen Blattbezirke bei den gepfropften Pflanzen höher zu sein.

Die in verschiedenen Linien vorhandenen *sulf^{vag}*-Allele (s. Tabelle 5) unterscheiden sich z. T. in der Stärke, mit der sie in Heterozygoten Laubblattscheckung hervorrufen.

Die Nachkommen gepfropfter *sulf^{vag}*-Pflanzen waren bisher (1957 und 1958) sämtlich gelb, selbst dann, wenn die Samen von Früchten stammten, die an grünen Scheckungsbezirken gebildet worden waren (s. Tabelle 6). Auch die Nachkommen nichtgepfropfter *sulf^{vag}*-Homozygoten waren im Jahre 1957 alle gelb. Die *sulf^{vag}*-Keimlinge verhielten sich wie die Pflanzen der Saatnummern, aus denen ihre Eltern stammten: Der größte Teil starb ab, einige wenige überlebten. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Grün-Bleich-Scheckung modifikativ auf der Grundlage idiotypisch gleicher Zellen entsteht, vergleichbar verschiedenen anderen, bei Pflanzen vorkommenden Musterbildungen.

Im Jahre 1958 wurden jedoch in den Nachkommenschaften mehrerer nicht-gepfropfter *sulf^{vag}*-Homozygoten einige grüne Keimlinge festgestellt. Ihre *sulf⁺*-Allele müssen durch Rückmutation (*sulf^{vag}* → *sulf⁺*) entstanden sein. Sollten sich diese Ergebnisse in den kommenden Jahren reproduzieren lassen, dann bedeutet das: Die grünen Blattbezirke gescheckter *sulf^{vag}*-Pflanzen entstehen nicht nur durch modifikatives Ergrünen von *sulf^{vag}*-Zellen, sondern z. T. auch durch Rückmutation solcher Zellen zu *sulf⁺*. Die modifikativen Veränderungen würden auch in diesem Fall überwiegen.

Die Dominanzverhältnisse

Das Normalallel *sulf⁺* ist vollständig dominant über alle *sulf*-Allele. Die in einem Teil der Heterozygoten auftretende Grün-Bleich-Scheckung entsteht nicht durch variable Manifestierung der *sulf*-Allele in den Heterozygoten, sondern beruht auf anderen Vorgängen (somatische Konversion), die im nächsten Kapitel eingehend behandelt werden.

Im Jahre 1956 wurde nur eine geringe Anzahl von Kreuzungen zwischen verschiedenen Allelen von *sulfurea* durchgeführt. Erst nach Pfropfung der Homozygoten im Jahre 1957 war es möglich, in größerem Ausmaß verschiedene *sulf*-

Allele miteinander zu kombinieren. Die Kreuzungsnachkommen werden als Pfropfungen 1958 geprüft. Eine Vorstellung von den

Dominanzverhältnissen zwischen den *sulf*-Allelen vermitteln die Kreuzungen von 1956 aber doch. Gepfropfte Pflanzen der Konstitution *sulf^{pura} 4 sulf^{pura} 1* hatten rein gelbe Blätter, wie es zu erwarten war. Von den F_1 -Generationen aus *sulf^{pura} 1* $\times$ *sulf^{vag} 1* und *sulf^{vag} 1* $\times$ *sulf^{pura} 1* wurden die Laubblätter der Pfropfreiser gescheckt, d. h. es dominierte bei reziproken Kreuzungen stets *sulf^{vag} 1*. Demnach dominiert, soweit geprüft, *sulf^{vag}* über *sulf^{pura}*.

D. Das Verhalten der heterozygoten Pflanzen

Die heterozygoten *sulf*⁺ *sulf*-Pflanzen haben vollständig grüne Kotyledonen (*sulf* wird als allgemeine Bezeichnung für alle *sulf^{pura}*- und *sulf^{vag}*-Allele benutzt). Sie sind im Keimlingsstadium von den homozygoten, grünen *sulf*⁺ *sulf*⁺-Individuen nicht zu unterscheiden. In der weiteren Entwicklung zeigt sich, wie bereits geschildert,



Abb. 4—9. Die wichtigsten Typen der Laubblattscheckung heterozygoter *sulf*⁺ *sulf*-Pflanzen

bei einem Teil der Pflanzen eine Grün-Bleich-Scheckung der Laubblätter (vgl. Schema 1). Diese Scheckung ist unregelmäßig (Abb. 4—9). Oft weisen die Blätter eine sektoriale Trennung grüner und bleicher Bezirke auf, häufig verläuft hierbei die Grenze auf der Mittelrippe. Manchmal erinnert die Verteilung der bleichen Zellen an das Aussehen von Periklinalchimären. Sehr oft aber sind

die Blätter auch völlig unregelmäßig gefleckt. Die Flecken haben verschiedene Größen. Sie können gelb oder weiß sein oder in der Farbe dazwischen stehen.

Ein weiteres Charakteristikum der Heterozygotenscheckung ist, daß regelmäßig neben gescheckten auch rein grüne Blätter vorkommen, oft sogar in größerer Zahl als gescheckte. Das Ausmaß der Scheckung ist sehr variabel. Es gibt Pflanzen, die an jedem Trieb neben grünen auch gescheckte Blätter haben. d. h. Pflanzen mit lauter „gescheckten Ästen“. Daneben findet man sehr oft Individuen, die viele grüne Äste und nur einen gescheckten Ast aufweisen. Bei intensivem Wachstum einer Pflanze kann, was allerdings nur selten geschieht, an einem gescheckten Ast der grüne Anteil ganz verschwinden und so ein rein gelber Seitentrieb entstehen.

Das Vorkommen grüner, gescheckter und gelber Äste bot die Möglichkeit, durch die getrennte Auswertung von Nachkommenschaften der verschiedenen Fruchtstände Rückschlüsse auf das Wesen dieser Scheckung zu ziehen. Die übrigen genetischen Arbeiten mit den *sulfurea*-Allelen und parallel dazu durchgeführte cytologische Untersuchungen halfen hierbei. Die folgenden, mit 1., 2. usw. bezeichneten Feststellungen geben die wesentlichsten Ergebnisse wieder.

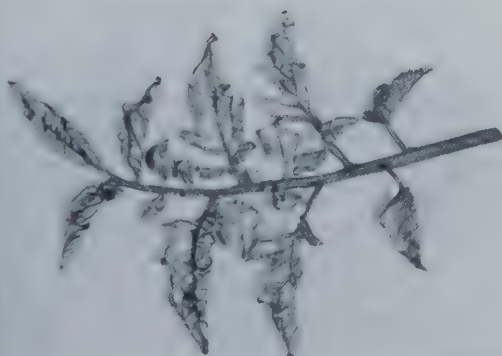
Im Jahre 1956 war eine Scheckung nur an den Laubblättern von Pflanzen solcher Saatnummern aufgetreten, die in der Keimblattfarbe 3:1 gespalten hatten (Schema 1). 1957 ergab sich weiterhin, daß die Nachkommenschaften gescheckter Pflanzen in grünblättrige und gelbblättrige Keimlinge spalteten (Tabelle 3). Die gescheckten Individuen waren demnach heterozygot gewesen.



7



8



9

Abb. 7—9

Das Auftreten und der Grad der Scheckung von Heterozygoten sind nach reziproken Kreuzungen zwischen homozygoten Mutanten und Kontrollen bei vergleichbaren Nummern gleich, d. h. unabhängig davon, ob die Mutante Mutter oder Vater war. In Tabelle 7 sind die Resultate des Jahres 1954 in der hier interessierenden Form zusammengestellt (vgl. Tabelle 1). Die Nachkommenschaften von im Jahre 1956 ausgeführten Kreuzungen verhielten sich ebenso (Tabelle 8). Hieraus ergibt sich:

Tabelle 7. *Scheckungsprozente der Heterozygoten nach reziproken Kreuzungen (1954)*

Kreuzung	Gesamtzahl der F ₁ -Pflanzen	Zahl der gescheckten Pflanzen	Prozentanteil der gescheckten Pflanzen
<i>a) Mutante als Mutter</i>			
Stark gescheckt × Lukullus	180	17	
Mittelstark gescheckt × Lukullus	209	17	
Schwach gescheckt × Lukullus	190	25	
	579	59	10,2
<i>b) Mutante als Vater</i>			
Lukullus × Stark gescheckt	307	24	
Lukullus × Mittelstark gescheckt	320	31	
Lukullus × Schwach gescheckt	219	39	
	846	94	11,1

Tabelle 8. *Scheckungsprozente der Heterozygoten nach Kreuzungen homozygoter Mutanten mit der Kontrolle (1957)*

Nr. 1957	Eltern 1956	Gesamtzahl der F ₁ -Pflanzen	Zahl der gescheckten Pflanzen	Prozentanteil der gescheckten Pflanzen
76	<i>vag 1</i> (208) × Kontrolle	40	2	5,0
77	Kontrolle × <i>vag 1</i> (208)	34	2	5,9
52	Kontrolle × <i>pura 4</i> (101)	40	27	67,5

1. *Mutierte nichtmendelnde, extrachromosomale Erbfaktoren wirken bei der Entstehung der Scheckung heterozygoter sulf⁺sulf-Pflanzen nicht mit.*

Bestimmte Linien, die von F₁-Pflanzen des Jahres 1954 abstammten, unterschieden sich voneinander durch den Prozentsatz an gescheckten Pflanzen unter den Heterozygoten. Es war möglich, einen nahezu kontinuierlichen Übergang zwischen Saatnummern zu finden, in denen überhaupt keine Heterozygoten, und solchen, in denen alle Heterozygoten gescheckt waren. Diese Linien wurden im Feldversuch gemeinsam angebaut. In der Tabelle 9 sind die angebauten Nummern der Jahre 1956 und 1957 nach der Häufigkeit des Auftretens von Scheckungen geordnet.

Sie wurde folgendermaßen bestimmt: Von spaltenden Nummern wurden 100 Pflanzen mit grünen Keimblättern im Freiland ausgepflanzt und die Zahl der unter ihnen auftretenden gescheckten Pflanzen festgestellt. Um den Prozentsatz der Heterozygotenscheckung berechnen zu können, wurde ein ideales Spaltungsverhältnis von 1 *sulf⁺ sulf⁺* : 2 *sulf⁺ sulf* (: 1 *sulf sulf*) vorausgesetzt und die Zahl der Gescheckten auf zwei Drittel der geprüften Pflanzen (von 100 also 66,7)

bezogen. Dagegen konnte bei Kreuzungsnachkommen (F_1 -Pflanzen), die alle *sulf*⁺ *sulf* waren, die Zahl der Gescheckten unmittelbar in Prozent aller geprüften Pflanzen ausgedrückt werden.

Die prozentuale Häufigkeit der Heterozygoten-scheckung wies eine große Variabilität auf. Es gibt zwar Fälle, in denen sie in beiden Jahren völlig oder fast gleich war, wie z. B. bei den Nummern 208, 219 und 238 1956; andere Linien hingegen zeigten Schwankungen bis zu 25% Scheckungshäufigkeit. Trotzdem ergibt sich eindeutig aus den Zahlen der Tabelle 9:

2. Zwischen einzelnen Linien traten Unterschiede im Scheckungsprozentsatz der Heterozygoten auf, die nicht durch modifikative Variabilität zustande kommen konnten, sondern durch eine genetische Verschiedenheit der jeweils vorhandenen *sulfurea*-Allele bedingt sein mußten.

Es ist nicht möglich, die Differenzen zwischen den in Tabelle 9 aufeinanderfolgenden Nummern statistisch zu sichern. Andererseits ist der Unterschied zwischen den Endgliedern klar. Man muß die hier mitgeteilten Befunde als Hinweis auf die Existenz mehrerer *sulfurea*-Allele betrachten, die sich unterscheiden durch die Stärke, mit der sie in Heterozygoten Scheckung auslösen. Ihre Trennung im einzelnen kann nur unter Zuhilfenahme anderer Methoden vorgenommen werden, die bereits besprochen wurden (Verhalten der *sulfurea*-Homozygoten in der Keimchale und nach Pflanzung).

Im Jahre 1957 konnte eine weitere Erscheinung beobachtet werden. Die heterozygoten Nachkommen einer Pflanze, die aus einer Saatnummer mit geringem Scheckungsprozentsatz stammte, zeigten eine sehr starke Scheckung. Die Nachkommenschaften anderer Pflanzen aus derselben Nummer verhielten sich herkunftsgemäß. Die veränderten Linien sind in Tabelle 9 durch ein * gekennzeichnet (s. 143/1957, 331/1957, 425/1957; die sich elterngleich verhaltende Geschwisternachkommenschaft steht jeweils eine Zeile vorher; bei 177/1957 ist ein solcher Vergleich nicht möglich). Es ist (sicher im ersten Fall, vielleicht auch in den drei anderen) mutativ ein neues *sulfurea*-Allel entstanden, das sich von dem Ausgangsallel in der Stärke unterscheidet, mit der es in Heterozygoten Scheckung hervorruft.

Im Gegensatz zu der bisher vorgetragenen Deutung könnte man versuchen, die verschiedenen Scheckungsprozentsätze der einzelnen Linien durch die Annahme von Modifikationsgenen zu erklären, welche die konstante Wirkung des *sulfurea*-Allels verstärken oder vermindern und auf diese Weise das unterschiedliche Ausmaß der Scheckung bewirken. Es gibt jedoch keine Beobachtungen, die eine solche Erklärung stützen könnten. Im Gegenteil,

Tabelle 9. Scheckungsprozente heterozygoter Pflanzen aus spät-tenden Nummern (1956 und 1957)

Nr. 1956	Nr. 1957	% 1956	% 1957
332	121	1,5	0
208	109	1,5	1,5
241	498	1,5	4,6
286	134	5,0	6,0
365	145	7,5	1,5
365	143	7,5	85,5*
172	161	18,0	10,5
343	177	18,0	69,0*
253	266	25,8	16,5
299	289	27,9	19,5
150	398	(54,0) ¹	21,0
179	422	(54,0)	28,5
179	425	(54,0)	64,5*
149	199	21,0	28,5
264	301	36,0	25,5
127	223	25,5	43,9
219	332	55,5	52,5
219	331	55,5	84,0*
321	241	25,4	55,5
101	349	56,1	82,5
238	447	73,5	73,5
146	451	88,5	86,2
354	374	87,0	60,0
354	372	87,0	97,5
220	463	100,0	88,5

¹ Bei den Saatnummern, deren Scheckungswerte in Klammern stehen, erfolgte vor dem Auspflanzen Selektion zugunsten gescheckter Pflanzen. Die Prozentzahlen liegen dementsprechend zu hoch.

* Veränderte Linien, s. Text.

mehrere Argumente sprechen dagegen: Es existieren nicht nur quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Allelen, sondern auch qualitative, nämlich die Verschiedenheiten zwischen *sulfpura* und *sulfvag* (vgl. Kapitel C). — Die Mutante *sulfurea* entstand in der Sorte Lukullus. Im Jahre 1953 wurde sie mit Lukullus gekreuzt. Es wäre kaum zu verstehen, wie seit 1954 die Modifikationsgene auf die verschiedenen Linien verteilt worden sein sollten. — Bei der Kreuzung von bestimmten *sulfurea*-Allelen mit der Lukullus-Kontrolle ist der Scheckungsprozentsatz der F_1 in den Variabilitätsgrenzen mit jenem gleich, der für die entsprechenden *sulfurea*-Allele typisch ist (vgl. Tabelle 8 und 9). — Wie geschildert, kann ein Allel, das eine geringe Scheckungshäufigkeit hervorruft, zu einem anderen mutieren, das eine sehr starke bewirkt (vgl. Tabelle 9: 143/1957—145/1957).

Alle diese Gründe sprechen dafür, daß im vorliegenden Falle Modifikationsgene entweder überhaupt keine oder nur eine ganz unwesentliche Rolle spielen, und daß an der Existenz mehrerer *sulfurea*-Allele nicht zu zweifeln ist.

Mit dem Auftreten der Scheckung erhob sich die Frage nach ihren Ursachen. Mit der Feststellung, daß alle gescheckten Pflanzen heterozygot waren, wurde eine zwar nicht sehr wahrscheinliche, aber durchaus denkbare Möglichkeit ausgeschaltet: das Vorliegen einer Prädetermination. Bei einer solchen hätte der heterozygote Zustand der Elternpflanze bei den Nachkommen eine Scheckung determiniert. Dann hätten auch homozygote *sulf⁺sulf⁺*-Pflanzen gescheckt sein müssen. Das war nicht der Fall. Nunmehr blieb die Alternative: Modifikation oder Mutation. Die Entscheidung brachten die Spaltungen in den Nachkommenschaften der gescheckten Pflanzen (Tabelle 3, Abt. I—IV). Die Abweichungen vom normalen 3:1-Verhältnis zwischen grünen und gelben Keimlingen zeigten:

3. In gescheckten *sulf⁺sulf⁻*-Pflanzen treten Mutationen des Normalallels *sulf⁺* zu einem *sulfurea* (*sulf⁻*)-Allel auf.

Für die andere, theoretisch auch noch mögliche Erklärung, nämlich selektive Befruchtung zuungunsten des Normalallels, die zur Ausschaltung der *sulf⁺*-Allele führen würde, gibt es keinerlei Belege. Die Tatsache, daß die Nachkommenschaften der nichtgescheckten heterozygoten Pflanzen normal 3:1 spalten, weist demgegenüber nachdrücklich darauf hin, daß es Mutationen sind, welche die Spaltungsabweichungen bewirken. Zugleich wird der Zusammenhang zwischen der Veränderung des Spaltungsverhältnisses und der Scheckung offenbar.

Würden die Nachkommenschaften der gescheckten Heterozygoten wie die der grünen normal 3:1 spalten, dann hätte man keinen Hinweis auf das Vorliegen von Mutationen. Man müßte eine modifikative Veränderung idiotypischer gleicher Zellen annehmen. Das trifft für die Scheckung der Heterozygoten nicht zu.

Das alles spricht dafür, daß die Scheckung durch Mutationen bewirkt wird, die auch die Veränderung des Spaltungsverhältnisses grün:gelb verursachen. Es ist jedoch notwendig, die Hinweise auf diesen Zusammenhang genauer zu verfolgen. Er kann erschlossen werden durch die Analyse der Nachkommenschaften gescheckter Pflanzen, besonders solcher, die sowohl grüne als auch gescheckte Äste haben. Die Nachkommenschaften grüner Äste spalteten 3:1. Die Abweichungen vom normalen Spaltungsverhältnis traten bei Nachkommen gescheckter Äste auf, sowie in den Nachkommenschaften gescheckter Pflanzen, bei denen es nicht möglich war festzustellen, ob die Fruchtstände zu einem grünen oder einem gescheckten Bezirk gehörten.

Einige Einzelergebnisse seien hier genannt. Das Spaltungsverhältnis in der Nachkommenschaft des grünen Astes von 220 II 6/1956 war normal (Tabelle 3, Abt. I: 101 grün:29 gelb); der gescheckte Ast brachte 7 grüne und 56 gelbe Keimlinge (Tabelle 3, Abt. III). Unter den 150 Nachkommen von der stark gescheckten Pflanze 354 B/1956 waren nur 3 grüne Keim-

linge (Tabelle 3, Abt. IV). Die in Tabelle 3 einzeln aufgeführten Spaltungsergebnisse von 1957 liefern noch zahlreiche weitere Belege für den Zusammenhang zwischen Scheckung und Spaltungsabweichung.

An stark gescheckten Ästen mehrerer heterozygoter Pflanzen wurden 1954 Früchte gebildet, deren Kelchblätter sämtlich grünlichweiß gescheckt waren. Sie brachten überhaupt keine grünen Keimlinge mehr (Tabelle 4). Auch in den Jahren 1956 und 1957 traten an Heterozygoten stark gescheckte Äste auf, deren Nachkommenschaften rein gelb waren, so an den Pflanzen 220 I 15/1956 (Tabelle 3, Abt. IV) und 143 V 6; 177 I 4 und IV 15; 199 I 6; 241 IV 12; 266 V 16; 301 I 20 und III 10 sämtlich 1957).

Im Jahre 1957 entstanden an mehreren stark gescheckten Freilandpflanzen rein gelbe Äste. Sie wuchsen langsamer als die grünen und blühten entsprechend auch später, trotzdem wurden einige reife Früchte gebildet. Dabei fiel auf, daß deren Kelchblätter manchmal weißgrün gesprenkelt waren, obwohl der Ast sonst rein gelb war. Entsprechend brachten einige Nachkommenschaften solcher gelber Äste neben gelben Keimlingen auch grüne (z. B. diejenigen von 143 V 19 AB 1957 und 199 I 6 AB/1957). Dagegen waren die Nachkommen von 143 IV 3 AT—AB/1957 und 374 II 18 AB/1957 sämtlich gelb. In den beiden letzten Fällen ist an den heterozygoten *sulf*⁺*sulf*-Pflanzen ein homozygoter *sulfurea*-Trieb entstanden.

Als allgemeines Resultat aus der Analyse der Nachkommenschaften gescheckter und gelber Äste ergibt sich: Je stärker ein Ast gescheckt ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit für die Erhöhung des Anteils gelber, d. h. homozygoter *sulfurea*-Keimlinge in seiner Nachkommenschaft.

In dieser Formulierung kommt eine gewisse Unsicherheit für die Voraussage im Einzelfall zum Ausdruck. Der Grund hierfür liegt im Wesen der Scheckung, in dem Nebeneinander grüner und bleicher Zellen in der gescheckten Pflanze. Je nachdem, ob die in der Nachbarschaft der gescheckten Blätter entstehenden generativen Zellen aus einem „grünen“ oder „bleichen“ Zellkomplex bzw. in dem Maße, wie sie aus „grünem“ und „bleichem“ Gewebe entstehen, wird das Zahlenverhältnis zwischen grünen und gelben Keimlingen verschieden sein.

Die angeführten Versuchsergebnisse und Überlegungen beweisen meines Erachtens, daß Scheckung und anomale Spaltungszahlen dieselbe Ursache haben: die Mutation *sulf*⁺→*sulf*.

4. Die Scheckung heterozygoter Pflanzen kommt zustande durch Mutation des Normalallels (*sulf*⁺) zu einem *sulfurea* (*sulf*)-Allel. In den bleichen Zellbezirken ist aus *sulf*⁺*sulf* der Genotyp *sulf sulf* geworden.

5. Die Mutation *sulf*⁺→*sulf* ereignet sich in den vegetativen Geweben des Sprosses. Sie betrifft auch generatives Gewebe, wenn die mutierten Zellbezirke an seiner Bildung teilnehmen.

Ob unabhängig davon die Mutation auch in generativen Zellen eintritt, ist nicht entschieden.

Das *sulf*⁺-Allel ist keineswegs ein labiles oder mutables Allel in dem Sinne, daß es konstant mit einer außerordentlich hohen Mutationsrate zu einem *sulf*-Allel mutiert (vergleichbar den labilen und mutablen Genen bei zahlreichen Organismen). Das Normalallel *sulf*⁺ ist im homozygoten Zustand völlig stabil. Auch die in den Jahren 1956 und 1957 geprüften Nachkommen von *sulf*⁺*sulf*⁺-Pflanzen aus spaltenden Nummern des Jahres 1955 zeigten weder Spaltung in der Keimblattfarbe noch Scheckung.

6. Dieses an sich stabile *sulf*⁺-Allel mutiert in heterozygoten *sulf*⁺*sulf*-Pflanzen unter dem Einfluß des bereits vorhandenen *sulf*-Allels bzw. als Folge eines spezifischen Zustandes, der durch das Zusammenwirken des *sulf*⁺- mit dem *sulf*-Allel gegeben ist, mit einer bestimmten Häufigkeit zu einem *sulf*-Allel.

Die gerichtete Mutation eines Allels in Richtung auf ein anderes, mit ihm in Heterozygoten vereinigt Allel heißt nach WINKLER (1930) eine „Konversion“. Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine somatische, „monogenische“ Konversion. Sie ist außerdem extrem „ungleich“, weil nur die Mutation vom dominanten $sulf^+$ zum rezessiven $sulf$ eintritt.

7. Der entgegengesetzte Vorgang, die Konversion $sulf \rightarrow sulf^+$ fehlt nach den bisherigen Befunden völlig.

8. Die Mutation tritt erst in einem ganz bestimmten Stadium der Ontogenese auf, nämlich nach der Anlage der Laubblätter. In den Keimblättern heterozygoter Pflanzen konnte sie noch nie beobachtet werden.

Es ist im vorigen Kapitel gezeigt worden, daß mehrere Allele von *sulfurea* existieren. Nun erhebt sich die Frage: Mutiert $sulf^+$ unter der Einwirkung z. B. eines bestimmten $sulf^{pura}$ -Allels ausschließlich zu diesem $sulf^{pura}$ oder induziert das $sulf^{pura}$ -Allel lediglich die Mutation von $sulf^+$ zu $sulf$, wobei sowohl das schon heterozygot vorhandene $sulf^{pura}$ als auch andere $sulf^{pura}$ - und $sulf^{vag}$ -Allele entstehen können? Wenn letzteres der Fall ist, in welchem Prozentsatz treten die anderen Allele auf? Die folgende Beobachtung gibt eine Antwort. Die stark gescheckte Pflanze 354 B/1956 war heterozygot für das Allel $sulf^{pura 3}$. Die von ihr abstammende Nr. 550/1957 spaltete in 3 grüne und 147 gelbe Keimlinge. Von den 147 gelben Pflanzen blieben 116 rein gelb und starben ab, wie es für $sulf^{pura}$ -Homozygoten typisch ist. Die restlichen 31 bildeten kleine grüne Flecke auf den Kotyledonen. Von ihnen überlebten nur 4 Pflanzen, die stark gescheckt waren; sie hatten ein $sulf^{vag}$ -Allel. Dieses Ergebnis bedeutet: In Nachkommenschaften, die, bedingt durch Konversion in der Mutterpflanze, nicht nur ein Viertel, sondern fast ausschließlich gelbe (= $sulf\ sulf$) Keimlinge enthalten, treten neben den *sulfurea*-Individuen, die homozygot für das $sulf$ -Allel der Elternpflanze sind, in geringer Menge gelbe Pflanzen mit einem anderen *sulfurea*-Allel auf.

E. Die Entstehung der *sulfurea*-Serie

Die verschiedenen *sulfurea*-Allele wurden aus zahlreichen Linien gewonnen, die sämtlich auf die eine gelbbunte Pflanze des Jahres 1949 zurückgehen. Es ist zu erklären, wie aus dem einen mutierten Allel die ganze Fülle der jetzt vorhandenen entstand. Die Ergebnisse der Jahre 1956 und 1957 gaben einige Hinweise auf die ablaufenden Veränderungen.

1. Beispiel (vgl. Tabelle 6a). Von den homozygoten $sulf^{pura 1}$ -Pfropfungen des Jahres 1956 wurden 1957 die Nachkommen geprüft. Von den 256 Keimlingen starben die nichtgepfropften ab. Alle erwiesen sich als $sulf^{pura}$. Unter den 288 Nachkommen der $sulf^{pura 4}$ -Pfropfungen des Jahres 1956 war jedoch 1 Pflanze, die überlebte und zu einem typischen $sulf^{vag}$ -Individuum wurde. Hier ist ein $sulf^{vag}$ -Allel aus $sulf^{pura}$ entstanden.

2. Beispiel. Die Saatnummer 365/1956 enthielt das $sulf^{pura 1}$ -Allel, das in Heterozygoten nur in sehr geringem Maße Konversionen hervorruft (Tabelle 5). Die zu ihr gehörende Pflanze 365 III 2/1956 war grün und, wie die Nachkommenschaft zeigte, heterozygot. Diese Nachkommenschaft (143/1957) unterschied sich von denen der anderen heterozygoten Pflanzen derselben Nummer (z. B. 145/1957) dadurch, daß ihre Heterozygoten starke Konversion zeigten. Fast alle $sulf^+ sulf$ -Pflanzen waren sehr stark gescheckt. In der Pflanze 365 III 2/1956 muß dem-

nach ein neues Allel vorhanden gewesen sein ($sulf^{pura^2}$, s. Tabelle 5), das entweder mit $sulf^{pura^3}$ identisch oder ihm doch außerordentlich ähnlich ist; $sulf^{pura^2}$ ist mutativ aus $sulf^{pura^1}$ entstanden. Phänotypisch unterscheiden sich beide im homozygoten Zustand überhaupt nicht, verändert wurde die Fähigkeit des Allels, in Heterozygoten $sulf^+$ zu konvertieren.

Damit sind die beiden Wege gefunden, die zur Entstehung der Serie multipler Allele am *sulfurea*-Locus geführt haben:

1. „normale“ Mutation eines *sulf*-Allels zu einem anderen in homozygoten *sulfurea*-Pflanzen (1. Beispiel) oder in grünen Heterozygoten (2. Beispiel).
2. Konversion, d. h. durch das rezessive Allel direkt oder indirekt ausgelöste Mutation des Normalallels $sulf^-$, die in der überwiegenden Zahl der Fälle gerichtet zu dem auslösenden Allel erfolgt, in einigen Fällen aber auch zur Entstehung eines anderen Allels führt (vgl. das unter D geschilderte Verhalten der Nr. 550/1957).

Über die Höhe der Mutationsrate, mit der der erstgenannte Vorgang abläuft, kann Gesichertes noch nicht gesagt werden, weil die Nachkommenschaften der gepfropften Homozygoten für eine derartige Prüfung bisher zu klein waren. Ebenso muß offenbleiben, ob Mutationen von $sulf^{pura}$ zu $sulf^{rag}$ (deren Häufigkeit am einfachsten festzustellen ist) in gleicher Zahl erfolgen wie solche in entgegengesetzter Richtung.

F. Diskussion

Die Konversionstheorie Winklers

Auf dem 5. Internationalen Kongreß für Vererbungswissenschaft 1927 in Berlin trug HANS WINKLER die Grundgedanken seiner Konversionstheorie vor, die er dann in dem Buch „Die Konversion der Gene“ (1930) weiter ausarbeitete. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Crossing-over-Theorie MORGANS und STURTEVANTS allein in der Lage, den Tatsachenkomplex des sog. Faktorenaustausches zu erklären. Das Ziel WINKLERS war es, dieser Theorie eine neue gegenüberzustellen, welche alle jene Tatsachen nicht nur auch erklären kann, sondern dies sogar einfacher und besser tut. Seine Konversionstheorie unterscheidet sich dadurch von der Crossing-over-Theorie, „daß sie den mechanischen Vorgang des gegenseitigen Austausches korrespondierender Chromosomenbruchstücke mit- samt den darin enthaltenen Genen ersetzt durch den physiologischen Vorgang der . . . Umwandlung von Genen aus dem einen Status (dem dominanten bzw. rezessiven Zustand) in den entgegengesetzten.“ (WINKLER 1930, S. 2.) Die Konversion der Gene „ist der in der Heterozygote, nicht aber in der Homozygote bei der Keimzellenbildung gesetzmäßig in bestimmtem Prozentsatz erfolgende Über- gang dominanter Gene in den rezessiven Zustand und umgekehrt.“ (S. 35/36.)

Dabei unterschied WINKLER zwischen digenischer und monogenischer Konversion. *Digenische* Konversion liegt vor, wenn in einer Gameten- oder Sporen- mutterzelle in beiden homologen Chromosomen (α und β) die Statusänderung der Allele erfolgt, d. h. im Chromosom α geht a^+ in a , im Chromosom β a in a^+ über. *Monogenische* Konversion ist gegeben, wenn in einer Zelle für das vorher heterozygote Allelenpaar Homozygotie eintritt, d. h. aus a^+a entweder a^+a^+ oder aa wird. Dabei kann in einer Gametenmutterzelle a^+a^+ , in einer anderen aa entstehen. Von diesen beiden Konversionstypen sind wiederum je zwei Arten möglich.

Bei *gleicher* Konversion tritt in einer bestimmten Gesamtheit von Gametenmutterzellen die Umwandlung des einen Allels in das andere (z. B. $a^+ \rightarrow a$) mit der gleichen Häufigkeit ein wie der entgegengesetzte Vorgang ($a \rightarrow a^+$). Bei *ungleicher* Konversion entsteht ein Allel häufiger als das andere.

Mit Hilfe dieser Grundannahmen hat WINKLER im einzelnen „bewiesen, daß die Austauschtheorie nicht die einzig mögliche Theorie ist, mit der die *normalen* Verhältnisse bei der Faktorenkoppelung zu erklären sind, sondern daß die Konversionstheorie dasselbe leistet“ (STERN 1930).

Durch die klassisch gewordenen Versuche mit doppelt heteromorphen Chromosomenpaaren, die gleichzeitig von CREIGHTON und McCLINTOCK (1931) an *Zea mays* und von STERN (1931) an *Drosophila melanogaster* durchgeführt wurden, konnte die Richtigkeit der Austauschtheorie MORGANS bewiesen werden. WINKLER (1932, 1933) versuchte zwar, auch diese Ergebnisse mit seiner Theorie zu erklären, mußte dabei aber z. T. äußerst unwahrscheinliche Zusatzannahmen einführen. Damit verlor die Konversionstheorie den Anspruch auf Gleichwertigkeit (STERN 1932). Der Versuch WINKLERS, die Crossing-over-Theorie durch die Konversionstheorie zu ersetzen, war damit fehlgeschlagen. Daran hat sich bis heute nichts geändert.

Offen blieb aber die Frage, ob eine Konversion von Allelen neben den Austauschvorgängen (Crossing-over) existiert¹. Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre gestatten, sie positiv zu beantworten. Dabei erscheint es zweckmäßig, zwischen meiotischer und somatischer Konversion zu unterscheiden.

Meiotische Konversion

Während das Vorkommen gleicher digenischer Konversion wohl nie mit Sicherheit zu beweisen ist, weil die entstehenden Allelverteilungen stets mit Crossing-over zu erklären sind, besteht bei ungleicher digenischer und bei monogener Konversion „theoretisch eine Möglichkeit, die Richtigkeit dieser Annahme experimentell zu prüfen, und zwar durch die genetische Tetradenanalyse“ (WINKLER 1930, S. 69). Das Vorliegen einer meiotischen Konversion scheint erwiesen, wenn in einer größeren als der durch die spontane Mutationsrate gegebenen Häufigkeit nach normalem Ablauf von Reduktionsteilung und Tetradenentwicklung bei Heterozygoten das Zahlenverhältnis 2:2 für ein bestimmtes Allelenpaar, dessen monohybrider Erbgang festgestellt ist, zu 4:0, 3:1, 1:3 oder 0:4 verändert ist.

Als Hinweise für die Richtigkeit seiner Vorstellungen konnte WINKLER lediglich einige Beobachtungen anderer Autoren an niederen Pflanzen anführen. Unter den Angiospermen gibt es nicht sehr viele geeignete Objekte für eine genetische Tetradenanalyse. WINKLER nannte *Salpiglossis variabilis*. Bei dieser Art konnte REIMANN-PHILIPP (1955) an Heterozygoten des Merkmalspaares N = normalblühend und n = appendicat 9 „Konversionstetraden“ finden (davon spalteten 8 im Verhältnis 1 N :3 n , und eine 3 N :1 n). Über Beobachtungen an *Marchantia polymorpha*, die auf Konversion hindeuten, berichtete BURGEFF (1943). Jedoch ist die endgültige Klärung dieser Erscheinungen noch nicht möglich gewesen.

¹ Die von WINKLER (1930, S. 168ff.) vorgenommene Gegenüberstellung Konversion — Mutation ist jedoch abwegig.

Aus dem Tierreich ist bisher nur ein Fall bekannt geworden, bei dem meiotische Konversion vorzuliegen scheint: das Verhalten der Mutante *reddish-alpha* von *Drosophila virilis* (DEMEREK 1926, 1928). *Reddish-alpha* Homozygoten züchteten rein weiter. Dagegen traten in Nachkommenschaften von Weibchen, die für *reddish-alpha* heterozygot waren, in bestimmter Menge Rückmutationen zu normal auf. DEMEREK konnte zeigen, daß mit der Zahl der Rückmutationen auch die Crossing-over-Häufigkeit in der unmittelbaren Nachbarschaft von *reddish-alpha* stark angestiegen war (vgl. unten).

Mit der stürmischen Entwicklung der Genetik der Mikroorganismen im letzten Jahrzehnt mehren sich auf diesem Gebiet Befunde, die für das Vorkommen von Konversionen sprechen.

Bei *Saccharomyces* wurde seit 1949 einige Male das Auftreten meiotischer Konversionen mitgeteilt, da nach Kreuzungen zwischen mutierten und normalen Hefen Ausnahmetetraden (4:0, 3:1, 1:3, 0:4) gefunden werden konnten (LINDEGREN 1949, 1953, 1955; LINDEGREN, LINDEGREN, DRYSDALE, HUGHES und BRENES-POMALES 1956; MUNDKUR 1949). LINDEGREN (1949) benutzte zur Bezeichnung dieses Tatbestandes von Anfang an den Begriff „gene conversion“, den er in Übereinstimmung mit WINKLER (1930) definierte als „the interaction, occurring at meiosis, between the dominant and the recessive allele in a heterozygote, resulting in the transformation of one or more dominant alleles into the corresponding recessive allele, or vice versa. Gene conversion is essentially a directed mutation occurring at meiosis as a result of the effect of homologous alleles upon each other; it does not occur (or is not apparent) at the meiosis of homozygous diploids“ (LINDEGREN 1955).

Gegen die Deutung der Ergebnisse bei *Saccharomyces* als Konversion haben WINGE und ROBERTS (1950, 1954 und 1957) Einwände erhoben und andere Möglichkeiten aufgezeigt, mit deren Hilfe im jeweiligen Einzelfall das Zustandekommen der Ausnahmetetraden, über die in den oben angeführten Arbeiten berichtet wurde, erklärt werden kann. Wenn es auch nicht möglich sein wird, diese Einwände gegen die bisherigen Resultate LINDEGRENS vollständig zu entkräften, so glauben wir doch, daß durch die LINDEGRENSchen Untersuchungen meiotische Konversion wenn schon nicht bewiesen, dann doch sehr wahrscheinlich gemacht worden ist. Am selben Objekt konnte dann ROMAN (1956) bei Beachtung der entsprechenden Fehlerquellen ebenfalls Ausnahmetetraden isolieren. Nach Kreuzung normaler Hefen mit Adeninmangelmутanten (ad^+ad) traten ein 4:0-, fünf 3:1- und sechs 1:3-Ausnahmeasci auf. Das Vorkommen meiotischer Konversion bei *Saccharomyces* ist somit nicht mehr zu bezweifeln.

Klare Fälle von meiotischer Konversion konnte M. MITCHELL (1955 b, 1956) bei *Neurospora crassa* finden. Sie arbeitete mit den Pyridoxin-Mangelmутanten *pdx*, *pdxp* und *pdxq*. Nach der Kreuzung von *pdx* mit normal (+) entstanden u. a. zwei Ausnahmeasci mit folgender Zusammensetzung der „Tetraden“: $+,pdx,+,+$ und $+,+,+,pdx$.

Neben diesem Resultat, das dem von WINKLER (1930) postulierten entspricht und mit den bei *Salpiglossis* und *Saccharomyces* gewonnenen Ergebnissen völlig übereinstimmt, traten bei *Neurospora crassa* noch anders geartete Befunde auf. M. MITCHELL (1955 a, b, 1956) und H. MITCHELL (1957) fanden bei der Untersuchung der Pyridoxin-Mangelmутanten und ST. LAWRENCE (1956) und ST. LAW-

RENCE und BONNER (1957) bei der Bearbeitung der *q*-Mutanten (= Niacin- bzw. Nikotinsäure-Mangelmutanten), daß nach Kreuzung zweier sich allel verhaltenden Mutanten in geringer Zahl *Wildformen* entstehen. Die Häufigkeit, mit der sie auftreten, ist gesichert größer als die spontane Rückmutationsrate der einzelnen Mutanten. Kreuzungen von $pdx \times pdxp$ lieferten z. B. folgende Ausnahmetetraden: $pdxp, +, pdxp, pdx$; $pdx, pdx, +, pdxp$; $+, pdxp, pdx, +$; $+, pdx, +, +$ (M. MITCHELL 1956). Die Kombination verschiedener *q*-Mutanten brachte prinzipiell dasselbe, ebenso die Mutantenkreuzungen von ROMAN (1956) bei *Saccharomyces*. GILES (1955), DE SERRES (1956), CASE und GILES (1957) und FREESE (1957a, b) stellten ähnliches bei anderen Mutanten von *Neurospora crassa* fest.

Die zunächst gleiche Beobachtung führte vor einiger Zeit zur Entdeckung der Pseudoallelie. Es hat sich gezeigt, daß die nach Kreuzung pseudoalleler Mutanten auftretenden Wild- bzw. Normalformen durch Crossing-over entstanden waren. Im Gegensatz hierzu konnte durch Verwendung von Markierungsgenen bei der Analyse des irregulären Verhaltens der oben genannten Mutantenkombinationen *ausgeschlossen* werden, daß die Ausnahmesporen durch Crossing-over entstanden, wenigstens durch „crossing over in the usual sense“ (ST. LAWRENCE 1956). Zugleich ergab sich aber, daß das Auftreten der Ausnahme-Allele in irgendeiner Weise mit einer erhöhten Crossing-over-Häufigkeit in der Chromosomenregion, in der die entsprechenden Loci liegen, zusammenhängen muß (M. MITCHELL 1956, ST. LAWRENCE 1956, ST. LAWRENCE und BONNER 1957).

Diese Vorgänge haben mit den oben geschilderten Konversionen bei *Neurospora* außerordentliche Ähnlichkeit. Sie wurden deshalb auch als Konversionen bezeichnet (BONNER 1956, M. MITCHELL 1956, H. MITCHELL 1957). An sich ist gegen die auf diese Weise vollzogene Begriffserweiterung wenig einzuwenden. Trotzdem sollte man, vor allem bei der Diskussion über die diesen Erscheinungen zugrunde liegenden Mechanismen, nicht vergessen, daß man *zwei* Tatsachengruppen zu erklären hat; und daß beide auf genau dieselbe Weise zustande kommen, ist von vornherein keineswegs sicher.

Somatische Konversion

Das Vorkommen von *somatischer* Konversion konnte RENNER (1937, 1939, 1942, 1957, 1958; RENNER und SENSENHauer 1942) bei *Oenothera* mitteilen. Er arbeitete mit *cruciata*-Pflanzen (*cr cr*), die kelchblattartig umgeformte, sepaloide Kronblätter haben. In günstigen Fällen spaltet die Alternative *normal-cruciata* monohybrid (OEHLKERS 1930b, RENNER 1937). Die Ringverkettungen der komplexheterozygoten *Oenotheren* können dies jedoch oft unterbinden. In der F_1 von Kreuzungen zwischen *cruciaten* und normalen (*Cr Cr*) Formen zeigt sich ein auffälliger Dominanzwechsel. Neben normalen Pflanzen treten voll *cruciate* und solche mit intermediärer Ausbildung der Kronblätter auf. Diese Variabilität in der Form der Blumenkrone kann schon an einem Individuum auftreten. Dem Dominanzwechsel liegen mutative Veränderungen zugrunde. Über das Wesen dieser Vorgänge trugen OEHLKERS und RENNER verschiedene Auffassungen vor.

OEHLKERS (1930a, b, 1935, 1938; s. auch SIEBS 1939) führte den Dominanzwechsel auf eine endonome Mutabilität der entsprechenden Gene zurück, die sich quantitativ verändern. Die „scheinbare“ Konstanz normaler Kronen wie auch *cruciaten* Formen kommt zustande, weil „die Mutabilität unterhalb der Grenze

phänotypischer Auswirkung bleibt. Phänotypische Labilität zeigt sich erst dann, wenn durch die Zusammenstellung der betreffenden Gene mit entsprechend anderen, deren Gesamtquantität in eine Zone gelangt, in der auch kleine quantitative Veränderungen sich äußern“ (OEHLKERS 1948, S. 48/49).

Dagegen kann nach RENNER *Cr cr* sowohl nach *cr cr* (cruciata Blüten) als auch nach *Cr Cr* (breitblättrige Blüten) mutieren. Das Allel *Cr* ist homozygot stabil, es wird erst labil unter dem Einfluß des *cr*-Allels in den Heterozygoten. „Der Dominanzwechsel . . . beruht . . . auf somatischer Konversion, die bald von rezessiven zum dominanten Status führt, bald vice versa.“ (RENNER 1937, S. 105.) RENNER (1942) stimmte mit OEHLKERS darin überein, daß die in den Heterozygoten, welche Dominanzwechsel zeigen, vorhandenen *cr*-Allele auch im homozygoten Zustand, also autonom, in verschiedenem Maße mutieren. Er konnte aber darüber hinaus das Vorhandensein einer Anregung der Mutation durch Heterozygotie, d. h. Konversion, belegen (vgl. OEHLKERS 1948, S. 49).

Das Verhalten des *cruciata*-Merkmals erscheint sehr verwickelt. Zum einen macht die Komplexheterozygotie von *Oenothera* verschiedene Deutungen desselben Kreuzungsergebnisses möglich (s. die Diskussion RENNER 1937, OEHLKERS 1938, RENNER und SENSENHAUER 1942, RENNER 1942). Zum anderen kann nach RENNER eine Konversion von *Cr cr* sowohl nach *Cr Cr* als auch nach *cr cr* erfolgen. Die oben geschilderten Veränderungen in den *sulfurea*-Heterozygoten zeichnen sich demgegenüber durch eine größere Einfachheit und, dadurch bedingt, Klarheit aus. Die Kreuzungs- und Spaltungsergebnisse sind eindeutig. Die Konversion vollzieht sich nur in einer Richtung (*sulf*⁺ → *sulf*).

Außer dem intensiv bearbeiteten Verhalten des *cruciata*-Merkmals bei *Oenothera* sind noch einige andere Fälle von somatischer Konversion mitgeteilt worden.

Die homozygoten Individuen der Mutante *deficiens^{globifera} (def^{gli})* von *Antirrhinum majus* (KUCKUCK und SCHICK 1930) bilden sehr oft normale Triebe, die entweder *def⁺ def^{gli}* oder, in einem erstaunlich hohen Prozentsatz, *def⁺ def⁺* sind (BAUR 1924, HERTWIG 1926). Nach IMAI (1934) entstehen die letzteren aus Zellen, die durch Rückmutation zunächst *def⁺ def^{gli}* geworden waren, danach aber weiter zu *def⁻ def⁺* mutierten. Dieser 2. Schritt soll durch das heterozygote *def⁺* „stimuliert“ werden, d. h. durch Konversion zustande kommen. [Dagegen wird in der Kombination von *globifera* mit dem Allel *chlorantha*, *def^{gli} def^{chl}*, die autonome Mutationsrate von *def^{gli}* um 66% herabgesetzt (HERTWIG 1926, IMAI 1934).]

Bei *Celosia cristata* trat das Allel *ap* für rosa (pink) Farbe auf, das somatisch in mehreren Schritten bis zu *A* (magenta-rot) mutiert. KIHARA (1940) stellte fest, daß das Allel *ap* sonst ganz stabil ist. Es wird mutabel in *A-ap*-Heterozygoten, wo es unter dem Einfluß von *A* zu *A* hin mutiert (vgl. RENNER 1942, S. 605).

Daneben gibt es eine ganze Reihe von Befunden, bei denen wahrscheinlich auch Konversion vorliegt, dies aber nicht sicher bewiesen ist. Über eine Steigerung der Mutationsrate automutabler Gene durch Heterozygotie wurde beim Mais berichtet. EMERSON (1922, 1929) zeigte für mutable Gene, welche die „Calico“-Färbung des Maisperikarps bewirken, daß die Mutationsrate bestimmter Allele in heterozygoten Pflanzen 2,7- bzw. 5mal größer ist als in homozygoten. HAYES (1917) berichtete ähnliches (s. hierzu STUBBE 1933). Auch bei *Antirrhinum majus* scheinen in Pflanzen, die heterozygot für die dominante Mutation *Eluta* (*El*; STUBBE 1941) sind, Rückmutationen zu normal häufiger vorzukommen als in Homozygoten (STUBBE 1933; dort wurde *El* noch als *Unicolor* [*Uni*] bezeichnet). Andere Fälle hat RENNER (1942) zusammengestellt und diskutiert; vgl. auch STUBBE (1938, S. 131—132).

Ein kompliziertes Verhalten zeigt die von LILIENFELD (1929) beschriebene Blattform-Mutante von *Malva parviflora*. Das unvollständig dominante, labile Allel *laciniata*, das die Bildung fein geschlitzter Blätter bewirkt, mutiert im Laufe der Ontogenese somatisch in kleineren oder größeren Schritten über verschiedene Zwischenstufen (weniger fein geschlitzte *laciniata*- und mehrere *incisa*-Stufen) bis zum hypernormalen oder *no*²-Typus. Triebe dieses Typus haben Blätter, die der *typica* (= *no*)-Blattform normaler Pflanzen sehr ähnlich, nur noch etwas mehr abgerundet sind. In Heterozygoten aus Kreuzungen von *no*² $\times$ *laciniata* oder *no*² $\times$ *incisa* vollzieht sich der Übergang des „niedrigeren“ Allels (*lac*, *inc*) zum Endzustand *no*² schneller als in homozygoten *lac*- oder *inc*-Pflanzen. Hier scheint demnach eine Konversion vorzuliegen (vgl. GOLDSCHMIDT 1950, RENNER 1957). Wenn jedoch instabile, *incisa*-Zustände mit normal (*no*) gekreuzt werden, dann ist der Ganzflächigkeitsgrad der Mutanten-Blätter in der F₂ im Vergleich zu der Nachkommenschaft des *incisa*-Elters verringert, „degradiert“. Die „Degradierung“ des *inc*-Typus nach *lac* hin ist bereits in der F₁ zu erkennen. Der Übergang von *laciniata* zu *incisa* und *no*² vollzieht sich durch Mutation, ebenso die „Degradierung“. In den Heterozygoten (*no* $\times$ *inc*) wird ein *incisa*-Allel unter dem Einfluß des Normalallels zur Rückmutation nach *laciniata* hin veranlaßt. Dieser, der Konversion entgegengesetzte Fall einer Wirkung, die verschiedene Allele in den Heterozygoten aufeinander ausüben, wurde von KAPPERT (1953) als „Reversion“ bezeichnet.

Der Konversionsmechanismus

Zur Bezeichnung der geschilderten Erscheinungen wurde von den meisten Autoren der Begriff der Konversion (gene conversion) benutzt (RENNER 1938, LINDEGREN 1949, KAPPERT 1953, REIMANN-PHILIPP 1956, BONNER 1956, M. MITCHELL 1956, H. MITCHELL 1957, ST. LAWRENCE und BONNER 1957). Dagegen machte ROMAN (1956) Vorbehalte gegen die Benutzung des Begriffes. BEADLE (1957) glaubte, ihn nicht verwenden zu können: „This special type of recombination has been called gene conversion but it is clearly not the same as the process postulated by WINKLER to account for normal crossing over. Prof. HOROWITZ has suggested that a more appropriate term for it would be ‘transmutation’.“ GLASS (1957) schlug vor, sowohl „Konversion“ als auch „Transmutation“ zu meiden, weil beide Worte früher in einem anderen Sinn gebraucht wurden, und lieber „Transreplication“ als völlig neu geprägten Terminus zu wählen. Nach meiner Ansicht sind diese Einwände kein ausreichender Grund, den Begriff Konversion zur Bezeichnung der vorliegenden Fakten nicht zu benutzen. RENNER (1938) und LINDEGREN (1949, 1956) haben mit Recht auf die Priorität WINKLERS hingewiesen. Dazu kommt noch, daß WINKLERS Versuch, die Crossing-over-Theorie durch seine Konversionstheorie zu ersetzen, bereits 1932 gescheitert war, und es heute niemanden mehr gibt, der WINKLER in diesem Punkte folgte. Die Möglichkeit einer Verwirrung ist damit von vornherein ausgeschlossen.

Über die Mechanismen, die den Vorgängen zugrunde liegen, macht der Begriff der Konversion im voraus keinerlei Aussagen (vgl. BONNER 1956)¹. Er soll lediglich der umfassende Begriff zur Bezeichnung all der Fälle sein, in denen verschiedene, in Heterozygoten vereinigte Allele erbliche Änderungen erfahren,

¹ FREESE (1957a, b) unterschied zur Erklärung der vorliegenden Erscheinungen zwischen einer „Konversionshypothese“ und einer „Switch-Hypothese“ (= verallgemeinerte Crossing-over-Hypothese). Der oben benutzte Begriff der Konversion läßt beide Möglichkeiten zu. Es ist deshalb nicht empfehlenswert, das Wort „Konversion“ im Sinne von FREESE zu verwenden.

deren Ursachen mit der Heterozygotie dieser Allele verknüpft sind, mit klassischem Crossing-over aber nicht erklärt werden können¹.

Experimentelle Daten über den Konversionsmechanismus liegen gegenwärtig noch kaum vor. Folgende Hypothesen zur Erklärung der meiotischen Konversion sind bisher vorgelegt worden:

1. SANSOME (1956) hat versucht, die Ergebnisse M. MITCHELL^s (1955a) auf der Basis von Crossing-over ohne Hinzutreten anderer Momente zu erklären. Da jedoch H. MITCHELL (1957) bei *Neurospora* durch Hitzeeinwirkung gewisse Unterschiede zwischen Crossing-over und Konversion feststellen konnte, scheint dies generell nicht möglich zu sein.

2. Nach Vorstellungen von LEDERBERG (1955) bestände die Möglichkeit, daß eine neu entstehende Chromatide nicht vollständig ihre Schwesterchromatide redupliziert, sondern ein Stück einer Nicht-Schwesterchromatide. Diese „Trans-replication“ würde die Entstehung von 3:1 Tetraden nach Kreuzungen von Mutante $\times$ Kontrolle erklären. Das Entstehen von Normalen aus Kreuzungen zweier alleler Mutanten würde verständlich (M. MITCHELL 1955a, ROMAN 1956, BEADLE 1957), wenn jede der beiden Mutanten den Teil des Gens im normalen Zustand enthält, der bei der anderen defekt ist. Dann kann in Ausnahmefällen eine Chromatide statt der defekten Genregion der Schwesterchromatide den normalen Abschnitt einer Nichtschwesterchromatide reduplizieren (vgl. die Darstellung der „Switch-Hypothese“ bei FREESE 1957a, b). Vorbedingung für den Ablauf dieses Mechanismus ist die Paarung der homologen Chromosomen.

3. LINDEGREN (1955) und M. MITCHELL (1956) sehen in der Konversion eine gerichtete Mutation, die durch eine noch unbekannte Eigenschaft des heterozygoten Zustandes bestimmter Allele ausgelöst wird. In dieser allgemeinen Form muß die Hypothese eine Chromosomenpaarung nicht notwendig fordern. Um jedoch bei ihrem Untersuchungsobjekt die Tatsache zu berücksichtigen, daß in der Chromosomenregion, in der der *pdx*-Locus liegt, eine höhere Crossing-over-Häufigkeit als gewöhnlich auftritt, postulierte M. MITCHELL, „that a pre-crossover event, some intimate association of chromatids, occurring at, or including, the pyridoxine locus is responsible for mutation occurring at meiosis“ (S. 291).

4. ST. LAWRENCE (1956) und BONNER (1956) gingen bei ihrem Erklärungsversuch von der Feststellung McCLINTOCK^s (1951) aus, daß die Insertion von Chromosomenmaterial (*Ds*) an oder in die Nähe eines Locus das Auftreten seines Mutantenallels bewirkt. Wird das inserierte Material entfernt, dann kann der Locus seine ursprüngliche Funktion wieder ausüben. (Auf welche Weise die Transposition von *Ds* erfolgt, ist noch offen.) Das Mutieren der Gene, die Konversion zeigen, und ihre Rückkehr zu normaler Funktion durch Konversion könnten auf ähnliche Weise vor sich gehen. Auch GOLDSCHMIDT (1957) erklärte einen vergleichbaren Fall bei *Drosophila* durch einen dem *Ac-Ds*-System beim Mais (McCLINTOCK 1951) ähnlichen Mechanismus. Er nahm einen „transductor“ an, der in seiner Wirkung dem Faktor *Ac* oder *Dt* (RHOADES 1938) entspricht.

¹ Allerdings besteht dabei die Gefahr, daß der Sinn eines solchen Oberbegriffes durch die Einbeziehung aller möglichen neuen Befunde allmählich zerfließt. Sollte dies drohen, dann könnte man versuchen, an der Winklerschen Definition festzuhalten, und die Fälle, bei denen nach Kreuzung zweier Mutanten Wildformen entstehen, einem anderen Begriff zuordnen.

Ins einzelne gehende Vorstellungen über den Mechanismus der somatischen Konversion sind noch nicht vorgelegt worden. Die geschilderten 4 Hypothesen umschließen ohnehin die wichtigsten Erklärungsmöglichkeiten. Es kann aber sein, daß verschiedene Fälle von meiotischer und somatischer Konversion durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden.

*Die Bearbeitung allgemeiner und spezieller Probleme der Konversion
bei den sulfurea-Mutanten*

In der Diskussion über den Konversionsmechanismus spielt die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Konversion und Chromosomenpaarung besteht (vgl. RENNER 1942), eine wichtige Rolle. Die Trennung beider Erscheinungen in der Meiose ist außerordentlich schwierig. Beim Prozeß der somatischen Konversion ist sie vielleicht einfacher möglich, weil somatische Paarung nur bei Dipteren und in wenigen anderen Fällen (THERMAN 1951) nachgewiesen ist. Für die weitere Untersuchung der Konversion am *sulf*-Locus erhebt sich daher die Frage: Kommen in den heterozygoten *sulf*⁺*sulf*-Pflanzen konversionsaktiver Linien somatische Paarung oder ähnliche Phänomene vor, die darauf hindeuten, daß die beiden homologen Chromosomen, die den *sulf*-Locus tragen, im Ruhekern in räumlicher Berührung sind? Ihre Bearbeitung kann Hinweise geben, ob Homologenpaarung die Voraussetzung für das Auftreten von somatischer Konversion ist, wie es beim Zutreffen der Hypothese 2 der Fall sein müßte, oder ob diese bei räumlichem Getrenntsein der beiden Allele durch physiologisches Zusammenwirken über eine gewisse Entfernung hin zustande kommt. Die Hypothesen 3 und 4 ließen diese Möglichkeit zu. Gegenwärtig gibt es sowohl Beobachtungen, die für das eine, als auch solche, die für das andere sprechen. Bei der cytologischen Analyse somatischer Zellen wird nicht nur zu untersuchen sein, ob eine somatische Paarung aller Chromosomen vorliegt. Es wäre durchaus möglich, daß nur die beiden Chromosomen paaren, in denen die *sulfurea*-Allele lokalisiert sind.

Ein weiteres Problem ist, inwieweit die Konversion gerichtet verläuft. ROMAN (1956) fand bei 8 genauer untersuchten Konversionstetraden von *Saccharomyces*, daß die durch Konversion entstandenen Adenin-Mangelmутanten von dem als Kreuzungselter verwendeten Allel nicht zu unterscheiden waren, obwohl ROMAN bisher 73 verschiedene Allele der Adeninloci trennen konnte. Die Konversionsvorgänge bei *sulfurea* scheinen nicht in dem Ausmaß gerichtet zu sein (s. Kapitel D). Vielleicht wird der Unterschied zu den Romanschen Resultaten aber auch durch eine geringe Automutabilität gewisser *sulfurea*-Allele nur vorgetauscht. Diese Frage wird durch Auswertung von *sulf*-Nachkommenschaften und entsprechenden Kreuzungen weiter verfolgt.

Die Wirkung vieler Gene wird von ihrem jeweiligen idiotypischen Milieu modifiziert. Inwieweit die Konversionspotenz bestimmter *sulfurea*-Allele zu verändern ist, werden Einkreuzungen dieser Allele in mehr oder weniger verwandte Sorten von *Lycopersicon esculentum* und in *Lycopersicon pimpinellifolium* zeigen.

Die Untersuchung, ob bestimmte *sulfurea*-Allele zu normal rückmutieren, die Prüfung der *sulf*-Allele einzelner Linien auf die Zugehörigkeit zu verschiedenen Allelengruppen, die eingehendere Feststellung der Dominanzverhältnisse in der *sulfurea*-Serie und Studien über die Abhängigkeit der Scheckungshäufigkeit von Außenfaktoren gehören zu weiteren Aufgaben.

Summary

1. In R 2 of X-irradiated tomatoes there appeared a recessive chlorophyll deficient mutant named *sulfurea* (*sulf*). In progenies of crosses to the parental variety "Lukullus" several different *sulf* alleles were isolated forming a series of multiple alleles (Table 5).

2. The homozygous seedlings of *sulfurea^{mura}* alleles (*sulf^{mura}* etc.) die within a fortnight, if not grafted on control stocks. Grafted plants have pure yellow leaves (Fig. 2, 3).

3. The homozygotes of *sulfurea^{variegata}* alleles (*sulf^{rag}* etc.) are semilethal. Surviving not-grafted *sulf^{rag}* plants (Fig. 1) as well as all grafted plants have green-white variegated cotyledons and foliage leaves (Fig. 2, 3). The differences between the green and the white cells are due to modifications.

4. Part of the heterozygous *sulf⁺sulf* plants has green-white variegated foliage leaves (Table 1, 7, 8, 9). The variegation is irregular (Fig. 4—9). Mutated extra-chromosomal factors are not involved (Table 7, 8). Several lines differ in the percentage of variegated plants to be found within the heterozygotes (Table 9). These differences are due to the action of different *sulf* alleles, indistinguishable in homozygous condition (Table 5, 9).

5. The progenies of green heterozygous plants or branches segregate 3 green: 1 yellow (Table 2, Table 3 div. I). In progenies of variegated branches deviations appear from normal 3:1 segregation ratio (Table 3 div. II—IV, Table 4). The more intensive the variegation of a branch, the greater the portion of homozygous *sulf sulf* seedlings in its progeny. The variegation is caused by mutation of the normal allele *sulf⁺* to a *sulf* allele. The white regions are of *sulf sulf* constitution. The mutations occur in somatic tissues. They extend to generative tissues, if mutated regions take part in the formation of reproductive organs.

6. The normal allele *sulf⁺* is stable in homozygotes. In heterozygous plants, however, the *sulf⁺*-allele mutates to a *sulf* allele under the influence of the already present *sulf* allele respectively as a result of a specific condition given by cooperation of the *sulf* and the *sulf⁺* allele. That is to say, the variegation of heterozygous *sulf⁺sulf* plants is caused by somatic conversion.

7. In the discussion it is differentiated between meiotic and somatic conversion. The hitherto known cases and their explanation are discussed.

Literatur

- BAUR, E.: Untersuchungen über das Wesen, die Entstehung und die Vererbung von Rassenunterschieden bei *Antirrhinum majus*. Bibliotheca genet. **4** (1924). Leipzig: Gebrüder Borntraeger. — BEADLE, G. W.: The role of the nucleus in heredity. In W. D. McELROY, and B. GLASS, A symposium on the chemical basis of heredity, p 3—22. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957. — BONNER, D. M.: The genetic unit. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 163 bis 170 (1956). — BURGEFF, H.: Genetische Studien an *Marchantia*. Einführung einer neuen Pflanzenfamilie in die genetische Wissenschaft. Jena: Gustav Fischer 1943. — CASE, M. E., and N. H. GILES: Evidence from tetrad analysis for both normal crossing over and "gene conversion" at the pan-2 locus in *Neurospora crassa*. Genetics **42**, 364 (Abstr.) (1957). — CREIGHTON, H. B., and B. MCCLINTOCK: A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **17**, 492—497 (1931). — DEMEREK, M.: *Reddish* — a frequently "mutating" character in *Drosophila virilis*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **12**, 11—16 (1926). — Mutable characters of *Drosophila virilis*. I. *Reddish-alpha* body character. Genetics **13**, 358—388 (1928). — EMERSON, R. A.: The origin of variations. Amer. Naturalist **52**, 64—79

- (1922). — The frequency of somatic mutation in variegated pericarp of maize. *Genetics* **14**, 488—511 (1929). — FREESE, E.: The correlation effect for a histidine locus of *Neurospora crassa*. *Genetics* **42**, 671—684 (1957a). — Über die Feinstruktur des Genoms im Bereich eines *pab* Locus von *Neurospora crassa*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 388—406 (1957b). — FREISLEBEN, R., u. A. LEIN: Vorarbeiten zur züchterischen Auswertung röntgen-induzierter Mutationen. II. Mutationen des Chlorophyllapparates als Testmutation für die mutationslösende Wirkung der Bestrahlungen bei Gerste. *Z. Pflanzenzüchtg* **25**, 255—283 (1943). — GILES, N. H.: Forward and back mutation at specific loci in *Neurospora*. *Brookhaven Symp. Biol.* **8**, 103—125 (1955). — GLASS, B.: A summary of the symposium on the chemical basis of heredity. In W. D. McELROY and B. GLASS, A symposium on the chemical basis of heredity, p. 757—834. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — GOLDSCHMIDT, R.: Marginalia to McCLINTOCK's work on mutable loci in maize. *Amer. Naturalist* **84**, 437—455 (1950). — On some phenomena in *Drosophila* related to so-called genic conversion. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43**, 1019—1026 (1957). — GUSTAFSSON, Å.: The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lunds Univ. Årsskr., N. F., Avd. 2* **36**, 1—40 (1940). — HADORN, E.: Begriffe und Termini zur Systematik der Letalfaktoren. *Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* **24**, 105—113 (1940). — HAGEMANN, R.: The chlorophyll deficient mutant *sulfurea* (an example of somatic gene conversion). *Rep. Tomato Genetics Coop.* No 8, p. 19—20, 1958. — HAYES, H. K.: Inheritance of a mosaic pattern color of maize. *Genetics* **2**, 261—281 (1917). — HERTWIG, P.: Ein neuer Fall von multiplem Allelomorphismus bei *Antirrhinum*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **41**, 42—47 (1926). — IMAI, Y.: On the mutable genes of *Pharbitis*, with special reference to their bearing on the mechanism of bud-variation. *J. Coll. Agric. (Tokyo)* **12**, 479—523 (1934). — KAPPERT, H.: Die vererbungswissenschaftlichen Grundlagen der Züchtung. Berlin u. Hamburg: Paul Parey 1953. — KIHARA, H.: Genetische Studien an gestreiften Sippen von *Celosia cristata*. *Botany and Zoology* **8**, 975—990 (1940). *Zit. nach Ref. Jap. J. Bot.* **11**, 57 (1941). — KUCKUCK, H., u. R. SCHICK: Die Erbfaktoren bei *Antirrhinum majus* und ihre Bezeichnung. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **56**, 51—83 (1930). — LEDERBERG, J.: Recombination mechanisms in bacteria. *J. cell. comp. Physiol.* **45**, 75—107 (1955). — LEHMANN, CHR. O.: Das morphologische System der Kultur-tomaten (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Züchter*, **3**. Sonderh. 1955. — LILIENFELD, F. A.: Vererbungsversuche mit schlitzblättrigen Sippen von *Malva parviflora* I. Die *laciniata*-Sippe. *Bibliotheca genet.* **13** (1929). — LINDEGREN, C. C.: The yeast cell. Its genetics and cytology. St. Louis: Educational Publ. 1949. — Gene conversion in *Saccharomyces*. *J. Genet.* **51**, 625—637 (1953). — Non-mendelian segregation in a single tetrad of *Saccharomyces* ascribed to gene conversion. *Science* **121**, 605—607 (1955). — Diskussion zu H. ROMAN, Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 183—184 (1956). — LINDEGREN, C. C., G. LINDEGREN, R. B. DRYSDALE, J. P. HUGHES and A. BRENES-POMALES: Genetical analysis of the clones from a single tetrad of *Saccharomyces* showing non-mendelian segregation. *Genetica* **28**, 1—24 (1956). — McCLINTOCK, B.: Chromosome organization and genic expression. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 13—47 (1951). — MITCHELL, H. K.: Crossing over and gene conversion in *Neurospora*. In W. D. McELROY and B. GLASS, A symposium on the chemical basis of heredity, p. 94—113. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957. — MITCHELL, M. B.: Aberrant recombination of pyridoxine mutants of *Neurospora*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 215—220 (1955a). — Further evidence of aberrant recombination in *Neurospora*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 935—937 (1955b). — A consideration of aberrant recombination in *Neurospora*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.* **26**, 285—298 (1956). — MUNDKUR, B. D.: Evidence excluding mutations, polysomy and polyploidy as possible causes of non-Mendelian segregations in *Saccharomyces*. *Ann. Missouri bot. Gard.* **36**, 259—281 (1949). — OEHLKERS, F.: Studien zum Problem der Polymerie und des multiple Allelomorphismus. I. *Z. Bot.* **22**, 473—537 (1930a). — II. *Z. Bot.* **23**, 967—1003 (1930b). — III. *Z. Bot.* **28**, 161—222 (1935). — Über die Erbllichkeit des *cruciata*-Merkmals; eine Erwiderung. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **75**, 277—297 (1938). — Genetik und Zytogenetik der Pflanzen. *Naturforsch. Med.* **2**, 17—60 (1948). — Das Leben der Gewächse. Ein Lehrbuch der Botanik. Bd. 1: Die Pflanze als Individuum. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — REIMANN-PHILIPP, R.: Genetische Untersuchungen an den Tetraden einer höheren Pflanze (*Salpiglossis variabilis*). *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 187—207 (1955). — RENNER, O.: Über *Oenothera atrovirens* Sh. et Bartl. und

über somatische Konversion im Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **74**, 91—124 (1937). — Kurze Mitteilung über *Oenothera*. III. Über gigas- und hemigigas-Formen und ihre Verwendung zur Untersuchung des *cruciata*-Merkmals. Flora (Jena) **133**, 215—238 (1939). — Beiträge zur Kenntnis des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. IV. Gigas-Bastarde. Labilität und Konversibilität der *Cr*-Gene. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 590—611 (1942). — Über den Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. V. Planta (Berl.) **48**, 343—392 (1957). — Über den Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. VI. Z. Vererb.-Lehre **89**, 14—35 (1958). — RENNER, O., u. R. SENSENHÄUER: Versuche über den Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. III. Weitere Belege für somatische Konversionen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 570—589 (1942). — RHOADES, M. M.: Effect of *Dt* gene on the mutability of the a_1 allele in maize. Genetics **23**, 377—397 (1938). — ROMAN, H.: Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 175—183 (1956). — SANSOME, E.: Crossing over in fungi, bacteria, bacteriophage and higher organisms. C. R. Lab. Carlsberg. Sér. physiol. **26**, 315—333 (1956). — SERRES, F. J. DE: The origin of prototrophs in crosses of purple adenine mutants in *Neurospora crassa*. Genetics **41**, 639—640 (1956). — SIEBS, W.: Neue Beiträge zur Kenntnis der Erbllichkeit des *cruciata*-Merkmals bei den Oenotheren. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **77**, 239—290 (1939). — STERN, C.: Konversionstheorie und Austauschtheorie. Biol. Zbl. **50**, 608—624 (1930). — Zytologisch-genetische Untersuchungen als Be- weise für die Morgansche Theorie des Faktorenaustausches. Biol. Zbl. **51**, 547—587 (1931). — Über die Konversionstheorie. Biol. Zbl. **52**, 367—379 (1932). — ST. LAWRENCE, P.: The *q* locus of *Neurospora crassa*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 189—194 (1956). — ST. LAWRENCE, P., and D. M. BONNER: Gene conversion and problems of allelism. In W. D. McELROY and B. GLASS, A symposium on the chemical basis of heredity, p. 114—122. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — STUBBE, H.: Labile Gene. Bibliographia genet. **10**, 299—356 (1933). — Genmutation. I. Allgemeiner Teil. Berlin: Gebrüder Borntraeger 1938. — Die Gene von *Antirrhinum majus*. IV. (Zur Angleichung der *Antirrhinum*-Nomenklatur an die Vorschläge der Nomenklatur-Kommission des VII. Internationalen Genetiker-Kongresses Edinburgh 1939). Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 401—493 (1941). — Mutanten der Kultur- tomate *Lycopersicon esculentum* Miller. I. Kulturpflanze **5**, 190—220 (1957). — THERMAN, E.: Somatic and secondary pairing in *Ornithogalum*. Heredity **5**, 253—269 (1951). — WINGE, Ö., and C. ROBERTS: Non-mendelian segregation from heterozygotic yeast asci. Nature (Lond.) **165**, 157 (1950). — Causes of deviations from 2:2 segregations in the tetrads of monohybrid yeasts. C. R. Lab. Carlsberg. Sér. physiol. **25**, 285—329 (1954). — Remarks on irregular segregations in *Saccharomyces*. Genetica **28**, 489—496 (1957). — WINKLER, H.: Die Konversion der Gene. Jena: Gustav Fischer 1930. — Konversionstheorie und Austausch-Theorie. Biol. Zbl. **52**, 163—189 (1932). — Konversionstheorie und Austauschtheorie. II. Biol. Zbl. **53**, 73—98 (1933).

Dr. RUDOLF HAGEMANN,

Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie
der Wissenschaften, Gatersleben (Kreis Aschersleben)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, und dem MPI für Virusforschung, Tübingen

DIE ERZEUGUNG VON MUTATIONEN DES TABAKMOSEKIVIRUS DURCH CHEMISCHE BEHANDLUNG SEINER NUCLEINSÄURE *IN VITRO*

Von

K. W. MUNDY und A. GIERER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. August 1958)

Einleitung

Seit durch die Arbeiten von MULLER (1927) mit Röntgenstrahlen, STUBBE (1940), OEHLKERS (1943), AUERBACH (1943) und AUERBACH u. ROBSON (1946) u. a. mit Chemikalien der Weg zur experimentellen Mutagenese gewiesen worden war, sind verschiedene Mutagene bekannt geworden. Bei ihrer physikalischen und chemischen Mannigfaltigkeit haben die meisten unter ihnen nur den auf verschiedene Weise erzielten Endeffekt gemeinsam: Unter der Nachkommenschaft von Objekten, die mit Mutagenen behandelt worden waren, treten in erhöhtem Maße aberrante Formen mit neuen Charakteren auf, die erbkonstant sind.

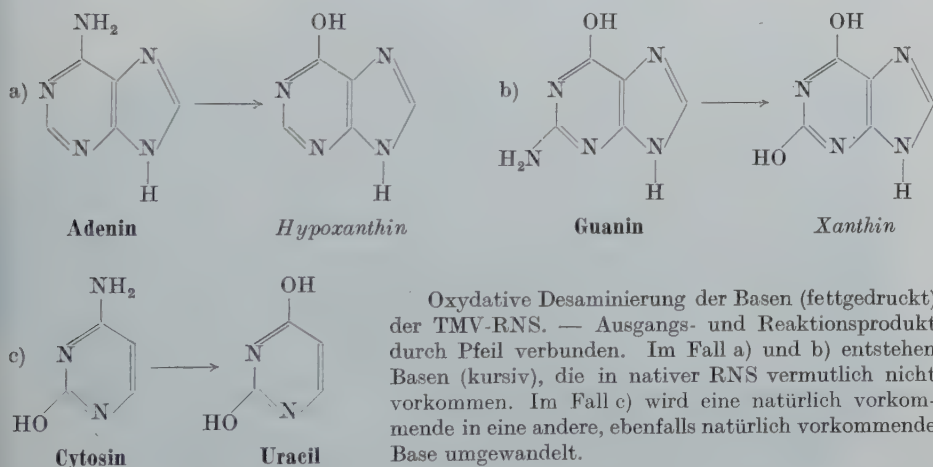
Zahlreiche Befunde der letzten Jahre sprechen dafür, daß die Nucleinsäuren (NS) die biochemische Grundlage für das Phänomen der Vererbung bilden. Mutagene Prozesse sollten demnach eine Veränderung der genetisch wichtigen NS zur Folge haben. Solche Veränderungen ereignen sich in der Natur innerhalb der lebenden Zelle auf dem Wege über den Stoffwechsel. Ob die experimentelle Mutagenese auch nur über diesen indirekten Weg erfolgt oder ob auch eine direkte Veränderung der NS im Organismus erreicht wurde, ist ungeklärt. Genetisch sich auswirkende Veränderungen von NS *in vitro* wurden bisher nicht nachgewiesen.

Für die Klärung der biochemischen Vorgänge, die zu Mutationen führen, sind Versuche mit definierten, isolierbaren Partikeln bzw. Molekülen wie den Viren und den isolierbaren NS vom Typ des transformierenden Prinzips der Pneumokokken (TPP) besonders geeignet. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, in denen durch Behandlung von virus-infizierten Zellen mit Strahlen (KAUSCHE u. STUBBE 1939, LATARJET 1948, WEIGLE 1953, WEIGLE u. DULBECCO 1953) bzw. Chemikalien (SILVESTRI 1949; LARSON et al. 1952, 1955) oder durch erhöhte Temperatur (MUNDY 1957b) die Mutationsrate sicher oder doch wahrscheinlich vergrößert werden konnte. Der Einbau von unphysiologischen Basen-Homologen in die Desoxyribonucleinsäure von Bakteriophagen über den Bakterienstoffwechsel gelang ebenfalls und führte zu einer außerordentlich erhöhten Ausbeute an Mutanten (z. B. BENZER u. FREESE 1958). Im Gegensatz zu solchen Versuchen konnte man durch Bestrahlung (KAUSCHE u. STUBBE 1939, MUNDY 1957a) oder durch Behandlung mit Chemikalien (LARSON l. c.) die Mutationsrate von Viren *in vitro* bisher nicht erhöhen. Die wenigen positiven Angaben (KÖHLER 1939, GOWEN 1941) lassen sich zwanglos auf Selektionsphänomene zurück-

führen (MUNDRY 1957a) oder sind ohnehin zweifelhaft. (Siehe Kritik von FRIEDRICH-FREKSA, MELCHERS und SCHRAMM, 1946). Ebensovienig war es möglich, durch direkte chemische Behandlung von Bakteriophagen bzw. des TPP *in vitro* mutative Veränderungen derselben herbeizuführen.

Ein geeigneter Zugang zu diesen Problemen ergibt sich jedoch aus den Befunden der letzten Jahre über die primäre Rolle der NS bei der Virusvermehrung. So wiesen HERSHEY u. CHASE (1952) im Falle der Bakteriophagen nach, daß die Virusproduktion in der Zelle von der DNS-Komponente der Phagen eingeleitet wird. GIERER u. SCHRAMM (1956) zeigten, daß die isolierte Ribonucleinsäure (RNS) des Tabakmosaikvirus (TMV) die infektiöse Eigenschaft des Virus besitzt und damit als dessen genetisches Material zu betrachten ist.

Das Partikel des TMV enthält die RNS in Form eines einzigen Moleküls. Dieses besteht aus etwa 6000 Nucleotiden, die wahrscheinlich einen *einfachen* Strang bilden (GIERER 1958). Die genetischen Eigenschaften des Virus sind offenbar durch die Anordnung der verschiedenen in der RNS vorkommenden Arten von Basen entlang dieses Stranges bestimmt. Die biologische Wirksamkeit eines Virus ist an die Integrität des Stranges gebunden (GIERER 1957, 1958; MUNDRY 1958). Dies bedeutet, daß ein einziger Bruch in der Sequenz der Nucleotide zum Verlust der Infektiosität führt. Darüber hinaus konnten SCHUSTER u. SCHRAMM (1958) kürzlich zeigen, daß die chemische Veränderung eines einzelnen der insgesamt 6000 Nucleotide genügen kann, um eine Inaktivierung des gesamten RNS-Moleküls herbeizuführen. Bei diesen Versuchen wurde



isolierte, infektiöse RNS des TMV der Einwirkung von salpetriger Säure ausgesetzt. Hierbei bleibt der RNS-Strang intakt, während einzelne Basen verändert werden. So kann Adenin in Hypoxanthin, Guanin in Xanthin und Cytosin in Uracil verwandelt werden. Die quantitative Auswertung der Experimente ergab, daß die chemische Veränderung jedes einzelnen von mindestens 3000 Nucleotiden letal ist. Die Versuche legen es andererseits nahe, daß auch solche Veränderungen vorkommen, die nicht letal sind. Es erhebt sich somit die Frage, ob derartige Veränderungen mutagenen Charakter haben können.

Aufbauend auf diese Arbeiten von SCHUSTER u. SCHRAMM haben wir versucht, die Entstehung von Mutanten durch Einwirkung salpetriger Säure auf die RNS des TMV nachzuweisen.

Ein leicht zu beobachtendes und quantitativ gut auswertbares Merkmal verschiedener TMV-Stämme ist das lokale Nekrotisierungsvermögen auf den Blättern des „Java“-Tabaks. Dieses Merkmal tritt nach den Erfahrungen im MPI f. Biologie nicht selten als spontane Mutation von Java-Tabak nicht-nekrotisierenden, also nur systemischen Stämmen des TMV auf. Die *dahlemense*-Gruppe ist u. a. durch dieses Merkmal charakterisiert (MELCHERS, SCHRAMM, TRURNIT und FRIEDRICH-FREKSA 1940¹). Wir benutzten als Ausgangsmaterial den TMV-Stamm *vulgare* (MELCHERS 1942), der dieses Merkmal nicht besitzt, und untersuchten, ob nach Inokulation von Java-Tabakblättern mit HNO₂-inkubiertem *vulgare*-TMV lokale Nekrosen entstehen. Darüber hinaus wurde in einem Fall das allgemeine Mutationsspektrum im Hinblick auf möglichst viele Merkmale durch Einzelherdübertragungen von „Xanthi“-Tabak (TAKAHASHI 1956) auf „Samsun“-Tabak untersucht.

Material und Methoden

a) *Virusmaterial*. Ausgangsmaterial für unsere Versuche ist der TMV-Stamm *vulgare*, zunächst nach Vermehrung auf Samsun-Tabak isoliert und in m/100 Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Für spätere Untersuchungen wurde *vulgare* auf Java-Tabak vermehrt, auf dem sich nekrotisierende Mutanten entsprechend manifestieren (MELCHERS 1942), und bei der Ernte diejenigen Blätter verworfen, die irgendwelche Nekrotisierungen aufwiesen. — Gelegentlich wurden andere Virusstämme in die Untersuchung einbezogen, ebenfalls solche, die das Merkmal, Java-Tabak zu nekrotisieren, nicht besitzen. Es handelt sich jedoch in jedem Falle wie bei *vulgare* um sorgfältig hergestellte Präparationen von Virus, was vor der Vermehrung durch Einzelherdpassagen auf *Nicotiana glutinosa* oder *Nicotiana tabacum* var. Xanthi necroticum² so gut wie möglich biologisch gereinigt worden war. Geringfügige Verunreinigungen durch Mutationen, die während der Groß-Vermehrung entstehen, sind immer unvermeidbar. Daß solche Verunreinigungen in unserem Falle unwesentlich sind, zeigten Vergleiche der spontanen Mutationsrate des auf Samsun-Tabak vermehrten mit der des auf Java-Tabak vermehrten *vulgare*. Trotzdem wurden die Präparate „*vulgare* VIII“ und „IX“ bevorzugt, bei denen es sich um Virus handelt, das auf Java-Tabak vermehrt worden und deshalb von java-nekrotisierenden Verunreinigungen weitgehend frei war.

b) *RNS-Präparation*. Die Darstellung infektiöser NS des TMV erfolgte nach der Phenol-extraktionsmethode von GIERER u. SCHRAMM (1956).

c) *Pflanzenmaterial*. Für die Versuche wurden nur ausgesucht gleiche Gruppen von Testpflanzen verwendet. Ihre Anzucht erfolgte unter üblichen Bedingungen in Tontöpfen und guter Komposterde unter Quarantäne im insektensicheren Gewächshaus. Dort blieben die Pflanzen bis zum Abbruch der Versuche. Alle zur Verwendung kommenden Materialien, so auch die Erde, wurden vor Gebrauch sterilisiert. Die mittlere Tagestemperatur betrug ~24°C, die mittlere Nachttemperatur ~18°C. Gelegentlich wurden die Pflanzen mit „Hakaphos“³ gedüngt. Die Xanthi-Pflanzen wurden wie üblich einige Tage vor der Inokulation auf die 5—6 bestentwickelten Blätter zurechtgeschnitten. Die Java-Tabakpflanzen wurden ungestutzt verwendet.

d) *Testmethoden*. Die Viruspräparate wurden unter Verwendung von Mulltupfern, aber ohne Karborund, auf die Oberseite der Blätter aufgetragen. Die Infektiosität der Präparate

¹ Dort sind Herkunft der Tabakrassen „Java“ und „Samsun“ beschrieben.

² Saatgut dieser Tabakrasse, die so schnell wächst wie Samsun-Tabak, aber das Gen *N* (nekrotische Primärreaktion auf alle TMV-Stämme) von *N. glutinosa* besitzt, erhielten wir vom Dep. of Plant Pathology, University of California, Berkeley (vgl. TAKAHASHI 1956).

³ Wir danken der BASF Ludwigshafen für fortlaufende Unterstützung unserer Arbeiten mit Dünge- und Pflanzenschutzmitteln.

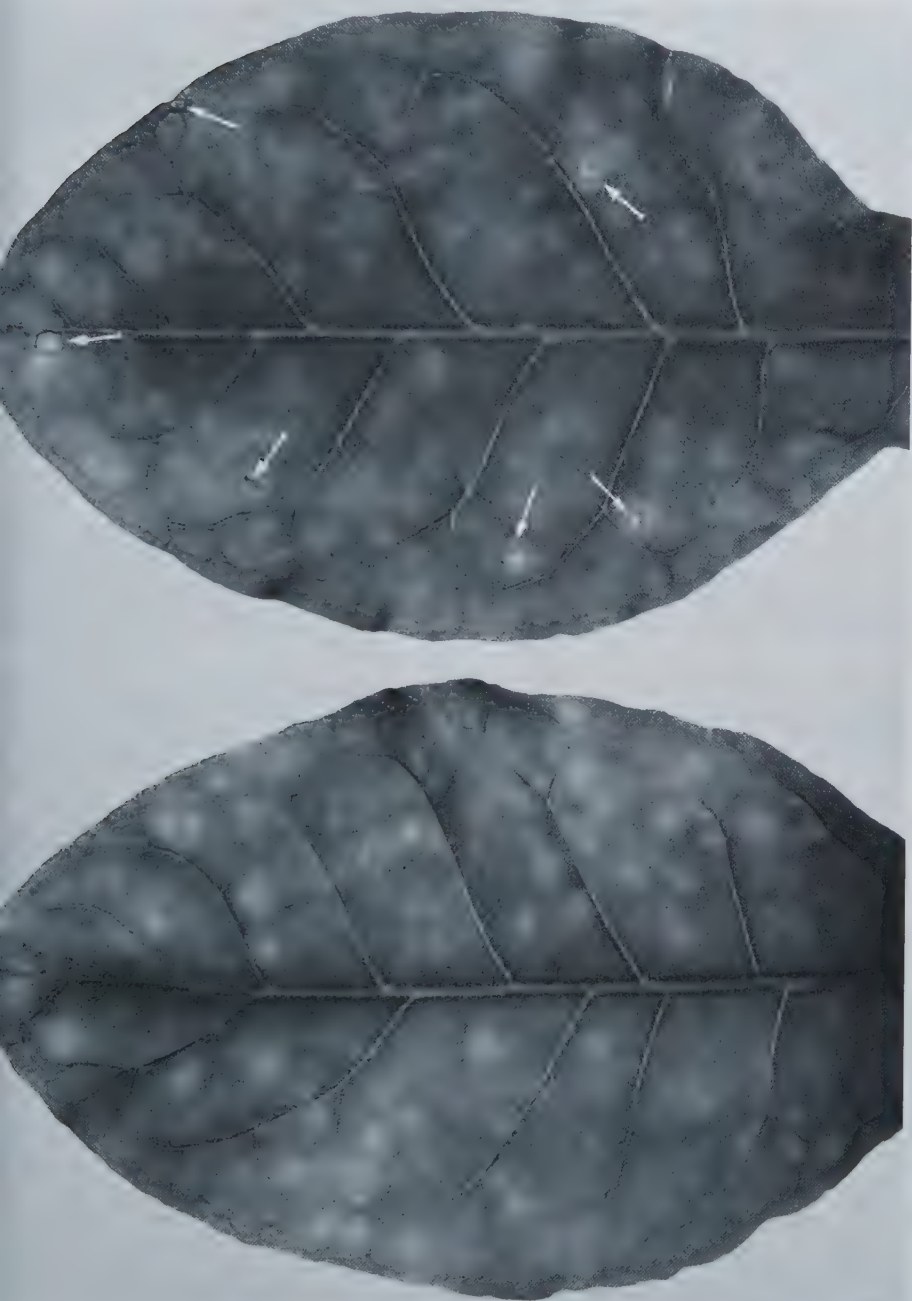


Abb. 1 a: Blatt des Java-Tabaks einige Tage nach Inokulation des TMV-Stammes *vulgare*. Die Infektionsherde sind als leichte Chlorosen sichtbar. — $0,3 \times 10^{-6}$ g TMV/ml Inokulum; Aufnahme mit Hellrot-Filter auf ADOX-KB 17-Film. — Abb. 1 b: Wie Abb. 1 a, doch Inokulation mit *vulgare*, das 20 min bei pH 4,2 in 1 Mol NaNO₂ inkubiert worden war. Neben den Chlorosen des Ausgangsmaterials sind 6 nekrotische Infektionsherde sichtbar (siehe Pfeile). — $0,7 \times 10^{-6}$ g TMV/ml Inokulum; Aufnahme auf AGFA-17-F-Film mit Hellrot-Filter

wurde auf *Nicotiana tabacum* „Xanthi nc.“ bestimmt¹. Die Zahl der pro Blatt (genauer: je Flächeneinheit der Blätter) entstehenden lokalen Nekrosen hängt von der Viruskonzentration im Inokulum ab und wurde dementsprechend ausgewertet (s. u.). — Unter günstigen Be-

¹ Vgl. Fußnote 2 vorige Seite.

dingungen sind auch die Infektionsherde von *vulgare*-TMV auf Java-Tabak sichtbar, und zwar in Form mehr oder weniger verwaschener, leicht chlorotischer Flecken (Abb. 1). Sie werden als „*vulgare*-Chlorosen“ bezeichnet und wurden, soweit irgend möglich, ebenfalls quantitativ ausgewertet. Die für diese *vulgare*-Chlorosen angegebenen Daten sind im Gegensatz zu den Nekrosezahlen auf Xanthi-Blättern, die auch noch bei ziemlich hoher TMV-Konzentration des Inokulums leicht bestimmt werden können, meistens nur als gute Schätzungen anzusehen.

Die quantitative Beziehung zwischen Zahl der Infektionsherde pro Blatt und Viruskonzentration im Inokulum wurde auf doppelt logarithmisches Millimeterpapier aufgetragen (vgl. Abb. 2). Sie stellt für jeden Versuch gesondert die Eichkurve dar, nach der zu den Nekrosezahlen der mit Nitrit inkubierten Präparate die Konzentration an infektiösem (Rest-)Virus

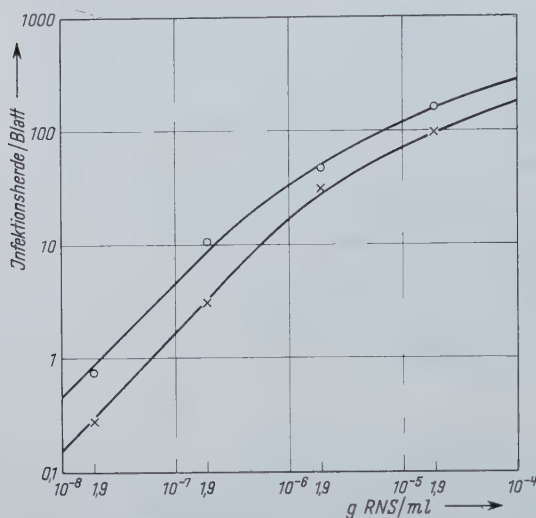


Abb. 2. Verdünnungskurve der Kontrollen aus Tabelle 2. *vulgare*-TMV auf Java-Tabak ○—○; dieselben Präparate auf Xanthi-Tabak getestet ×—×

ermittelt wurde. — Nicht selten waren die Chlorosen auf Java-Tabak bei einigen Blättern nicht auswertbar (sie waren bereits ineinandergeflossen, ehe sie sichtbar geworden waren). Da die Infektionszahlen pro Blatt sehr vom Alter der Blätter, d. h. von ihrer Position am Sproß, abhängen, wurden in solchen Fällen zunächst die Mittelwerte aus den Nekrosezahlen gleich alter Blätter und dann aus den für verschieden alte Blätter erhaltenen Mitteln die durchschnittliche Infektionszahl pro Blatt gebildet.

e) Inkubation von Virus und RNS mit Nitrit¹. Nach SCHUSTER u. SCHRAMM wurde TMV in leicht saurer, 1 Mol NaNO₂ enthaltender Lösung inkubiert. Hierbei werden 2 Teile Virus- bzw. RNS-Lösung in m/100 Phosphatpuffer pH 7 mit je einem Teil 1 n Acetatpuffer und 4 m NaNO₂-Lösung versetzt. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung ist stark abhängig

von der H-Ionen-Konzentration des Acetatpuffers. Intaktes TMV-*vulgare* wird z. B. bei einem pH von 4,2 und 22° C in 1 Std auf ungefähr 1% seiner ursprünglichen Konzentration an infektiösem Virus inaktiviert, seine isolierte NS mit etwa gleicher Geschwindigkeit schon bei pH 4,5. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wird die Reaktion durch Neutralisation der Lösung unterbrochen. Dies geschah in der Regel durch Verdünnen des Inkubates auf die für das Inokulum gewünschte Konzentration mit m/15 Phosphatpuffer pH 7. In den Vorversuchen mit TMV wurde restliches Nitrit durch Dialyse beseitigt. Dies erwies sich für den Fall konzentrierterer Inkubate, die für die Infektion stark verdünnt werden konnten, als unnötig. — Die Kontrollen werden mit einer Nitritkonzentration versehen, die der in dem zum Inokulum fertig verdünnten Inkubat entspricht. Die Konzentration im Inokulum beträgt etwa 10⁻⁶g/ml bei Virus- bzw. 2×10⁻⁶g/ml bei den NS-Lösungen.

Ergebnisse

a) Vorversuche. Zur qualitativen Orientierung wurde zunächst Virus, das durch längere Nitriteinwirkung um mehrere Zehnerpotenzen inaktiviert worden war, in relativ hoher Konzentration auf „Java“- und „Xanthi“-Tabak getestet. Hiermit wird verdünntes, unbehandeltes Virus verglichen. Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß das auf diese Weise mit Nitrit behandelte Virus eine sehr große

¹ Das chemisch wirksame Reagens ist bei einer angesäuerten Nitrit-Lösung die *salpetrige Säure*. Der Einfachheit halber sprechen wir von „Nitrit-Inkubation“.

Tabelle 1. *Effekt einer Inkubation von Java-Tabak nichtnekrotisierendem vulgare-TMV auf das Nekrosebildungsvermögen dieses Virus*

Konzentration im Inkubat: 4,4 mg Virus/ml; pH-Wert während der Inkubation: 4,1; Nitrit-Konzentration im Inkubat = 1 molar; Verdünnung nach 1, 2, 3 und 4 Std mit m/15 Phosphat-Puffer pH-Wert = 7,0 auf 0,44 mg Virus/ml, dann gegen gleichen Puffer dialysiert und auf Java-Tabakblätter inokuliert.

Gruppe	TMV-Konzentration im Inokulum (10^{-6} g/ml)	1. Versuch Nekrosen/Blatt auf		2. Versuch Nekrosen/Blatt auf	
		Xanthi	Java	Xanthi	Java
Inkubiert mit NaNO_2 bei pH 4,1	1 Std	440	558	345	277
	2 Std	440	187	53	37,5
	3 Std	440	2	1	8,21
	4 Std	440	0,36	0,29	—
Unbehandelte Verdünnungskontrolle	4,4	409	1,9	257	1,4
	0,44	168	0,5	56	0,63
	0,044	26,3	0,16	8,6	0,13
	0,0044	2,08	0,045	0,8	nicht getestet

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Entstehung lokal-nekrotisierender Infektionsherde aus nichtnekrotisierender vulgare-RNS von der Dauer der Nitrit-Einwirkung*

Konzentration im Inkubat: $9,5 \times 10^{-4}$ g RNS/ml; pH-Wert im Inkubat: 4,8; Nitrit-Konzentration im Inkubat = 1 molar. Verdünnung nach 1–96 min mit m/15 Phosphat-Puffer pH 7,0 auf $1,9 \times 10^{-5}$ g RNS/ml.

RNS-Konzentration (10^{-6} g/ml)	Inkubationsdauer (min)	Xanthi-Nekrosen je Blatt	Java-Nekrosen - Chlorosen je Blatt = Summe P. S.	Java-Nekrosen je Blatt	Java-Nekrosen < 100 Summe P.S. (%)
19	1	72,8 ³	183 ³	1,4	0,77
19	4	72,4 ³	130 ³	2,5	1,9
19	8	89,8 ³	188 ³	4,5	2,4
19	16	59,3	97	5,4	5,6
19	32	36,1	63	6,6	10,5
19	64	10,4	21,4	2,1	9,8
19	96 ¹	2,72	3,5	0,54	15,5
19	0	155	137,5	0,29	0,21
1,9	0	31,2	41,7	0,13	0,31
0,19 ²	0	3,06	10,4	0	0
0,019	0	0,28	0,75	0	0

¹ In dieser Gruppe wurden insgesamt 60 Xanthi-Nekrosen gezählt. Sie lieferten das Ausgangsmaterial zu dem in Tabelle 4 beschriebenen Abimpfungsexperiment. Die in Abb. 6 dargestellten Mutanten entstammen dieser Gruppe.

² In dieser Gruppe wurden insgesamt 65 Xanthi-Nekrosen gezählt. Diese lieferten das Ausgangsmaterial für die Kontrollen im Abimpfungs-Experiment der Tabelle 4 und den in Abb. 7 z. T. dargestellten Kontrollen.

³ Für die Ermittlung von τ (d. h. für die Inaktivierungskurve) wurden diese Werte mit denen der ersten Kontrolle (19×10^{-6} g RNS/ml) gemittelt und das Mittel als 3 min-Wert verwendet.

Anzahl von Nekrosen auf Java-Tabak erzeugt, während unbehandeltes Virus der gleichen (auf Xanthi-Pflanzen bestimmten) Infektiosität auf Java-Pflanzen nur ganz wenige Nekrosen hervorruft. Abb. 1b stellt ein Java-Tabakblatt dar, das

mit nur 20 min mit Nitrit behandeltem *vulgare*-TMV inokuliert wurde. Man erkennt neben den chlorotischen Infektionsherden des *vulgare* deutlich einige nekrotische Infektionsherde.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß diese Nekrosen auf Mutanten zurückgeführt werden müssen, die erst durch die chemische Behandlung des Virus bzw. der RNS *in vitro* erzeugt wurden.

b) *Quantitative Analyse.* Für eine quantitative Analyse wurde lediglich die Zeit der Einwirkung des Nitrits variiert und die übrigen Bedingungen im Verlauf einer

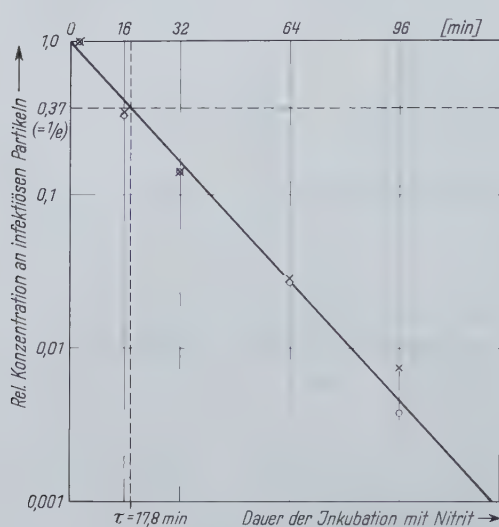


Abb. 3. Inaktivierungskurve zu den Daten aus Tabelle 2; für Tests auf Java-Tabak $\circ$ — $\circ$, auf Xanthi-Tabak $\times$ — $\times$. Die für eine Inaktivierung auf 37% jeweils benötigte Zeit gibt die „reduzierte Zeit τ “

Zeitreihe konstant gehalten. Die Tabelle 2 enthält eine derartige Meßreihe für isolierte RNS des TMV-Stammes *vulgare*. Man erkennt, daß die Zahl der auf Java-Tabak bei konstanter RNS-Konzentration erzeugten lokalen Nekrosen zunächst stark ansteigt und im weiteren Verlauf der Inkubation wieder absinkt. Der Anteil der Nekrosen unter der Gesamtzahl aller Infektionsherde steigt stetig an.

Nach den Versuchen von SCHUSTER u. SCHRAMM erfolgt die Inaktivierung mit Nitrit durch die chemische Veränderung einzelner Nucleotide und daher exponentiell mit der Zeit:

$$n = n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1)$$

(n = Konzentration der infektiösen Partikel nach der Zeit t ; n_0 = Konzentration der infektiösen Partikel zur Zeit $t = 0$).

Die Zeit τ definiert diejenige Zeit, nach der die Zahl der infektiösen Partikel auf $1/e$, d. h. auf 37% des ursprünglichen Wertes, abgesunken ist. Auf Grund der Verdünnungsreihen kann für jeden Infektiositätswert nach der Nitrit-Inkubation die dazugehörige Konzentration n an infektiösen Partikeln bestimmt werden. Die Zeit τ ergibt sich dann nach Gleichung (1), indem man den $\log$ der Konzentration gegen die Zeit aufträgt. So erhält man z. B. auf Grund der Meßwerte aus Tabelle 2 die in Abb. 3 dargestellte Inaktivierungskurve. Man erkennt, daß die auf Xanthi- und Java-Tabak gemessenen Werte auf eine gemeinsame Kurve fallen und sich auf diese Weise gegenseitig stützen. Für den in Tabelle 2 und Abb. 2 und 3 wiedergegebenen Versuch ergibt sich ein τ von 18 min.

Erfolgt die Entstehung von Mutanten ebenso wie die Inaktivierung durch die chemische Veränderung einzelner Nucleotide und entfallen auf jede Inaktivierung p mutagene Veränderungen des gesuchten Phäns, so erwartet man ein lineares Ansteigen des Anteils der Mutanten an den „überlebenden“ Viruspartikeln nach der Gleichung

$$\frac{m}{n} = p \cdot \frac{t}{\tau} \quad (2)$$

(m = Konzentration der nekrotisierenden Mutanten).

Die Gesamtkonzentration an Mutanten ergibt sich hingegen durch Kombination von Gleichung (1) mit Gleichung (2) zu

$$m = p \frac{t}{\tau} n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3)$$

oder bezogen auf den Maximalwert von m

$$\frac{m}{m_{\max}} = e^{-\frac{t}{\tau}} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4)$$

Es ist anzunehmen, daß Gleichung (2) und (3) nur für einen begrenzten Zeitraum t gelten, da nach längerer Einwirkung von Nitrit Sättigungseffekte möglich sind. Die Gleichung (3) wird angenähert die Zeitabhängigkeit der produzierten Nekrosen durch Nitrit-Einwirkung darstellen, solange die Nekrosenzahl der Konzentration der Mutanten annähernd proportional ist.

Würden die Mutationen dagegen auf der gleichzeitigen Veränderung von mehreren (nämlich v) Nucleotiden beruhen, so müßte sich eine Beziehung von folgendem Typ ergeben:

$$\frac{m}{n} = \text{const. } t^v, \quad (5)$$

$$m = \text{const. } t^v \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (6)$$

Die vorstehenden Gleichungen gestatten, Messungen, die unter sehr verschiedenen Bedingungen ausgeführt worden sind, einheitlich darzustellen. Dies geschieht durch Reduktion sämtlicher Meßpunkte auf die den Bedingungen entsprechende Zeit τ , die unabhängig gemessen wurde. Dem gleichen Wert $\frac{t}{\tau}$ entspricht jeweils der gleiche Bruchteil chemisch veränderter Basen in der RNS.

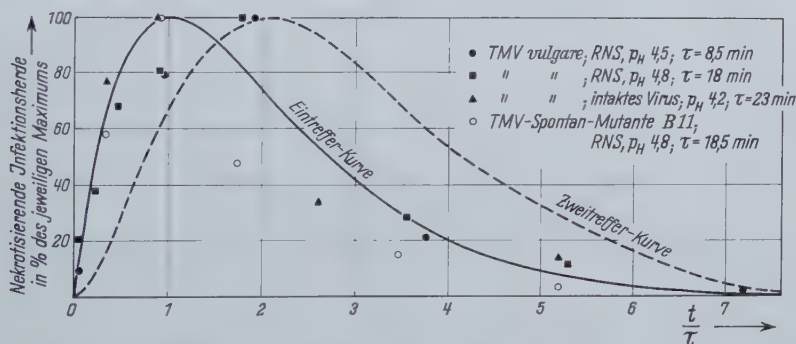


Abb. 4. Abhängigkeit zwischen der absoluten Zahl je Blatt gefundener nekrotisierender Mutanten und der Dauer der Nitrit-Einwirkung, letztere dargestellt durch den Quotienten „Behandlungsdauer: reduzierte Zeit τ “ (vgl. Abb. 3 zur Bestimmung von τ)

Auf diese Weise lassen sich Messungen unter sehr verschiedenen Bedingungen miteinander vergleichen. Für jede einzelne Meßreihe ist zunächst, wie an dem vorangehenden Beispiel dargestellt, die Zeit τ auf Grund der Inaktivierungskurve bestimmt worden. Sodann wurde für jedes Experiment gesondert die Zahl der gefundenen Nekrosen — bezogen auf den jeweiligen Maximalwert — in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. In Abb. 4 sind die so ermittelten Werte

gegen $\frac{t}{\tau}$ aufgetragen und mit der theoretischen Kurve, Gleichung (4), der Eintreffer-Reaktion verglichen. Es besteht gute Übereinstimmung. Dies gilt für Messungen an *vulgare*-TMV und der daraus isolierten RNS unter 2 verschiedenen Bedingungen sowie für RNS des Stammes *B 11*¹. Für die Entscheidung zugunsten der Eintreffer-Reaktion sind die Anfangswerte bei kleinen Inkubationszeiten besonders charakteristisch. Der lineare Anstieg der experimentellen Werte weicht hier stark von dem parabolischen Anstieg der Mehrtrefferkurve ab (Abb. 4). In Abb. 5 ist der Anteil der nekrotisierenden Infektionsherde an der

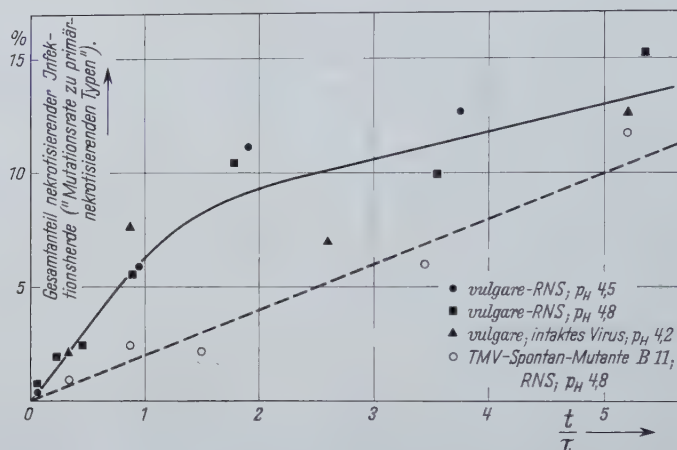


Abb. 5. Abhängigkeit des Anteils nekrotisierender Typen unter der Summe aller Infektionsherde auf Java-Tabak (Nekrosen + Chlorosen, vgl. Abb. 1b, = „Mutationsrate“) von der Dauer der Nitrit-Einwirkung bei 2 TMV-Stämmen. Abscissen-Abschnitte wie bei Abb. 4

Gesamtzahl aller Infektionsherde auf Java-Tabak in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, wobei als Zeiteinheit wiederum die reduzierte Zeit τ gewählt wurde. Man erkennt auch hier den zunächst linearen Anstieg der erzeugten Nekrosen mit der Zeit entsprechend der Eintreffer-Reaktion. Das nachfolgende Abbiegen der Kurve ist möglicherweise auf den erwähnten Sättigungseffekt zurückzuführen. Auch der Stamm *B 11* des TMV zeigt den linearen Anstieg des Anteils der Nekrosen mit der Zeit. Für die charakteristische Zeit $t = \tau$ ergibt sich bei *vulgare* ein Anteil von etwa 6% Mutanten unter den „Überlebenden“ und bei *B 11* von etwa 2%. Falls die „plating efficiency“ durch die Mutation nicht verändert wird, entspricht dies nach Gleichung (2) dem Verhältnis p der mutagenen zu den letalen Treffern. Da nach SCHUSTER und SCHRAMM die Veränderung jedes einzelnen unter etwa 3000 Nucleotiden letal wirkt, gäbe es auf der RNS des Stammes *vulgare* 6% hiervon, nämlich 180 Nucleotide, deren Veränderung zu einer Mutante mit dem Java-Nekrotisierungs-Merkmal führen würde. Die Voraussetzung zu dieser Abschätzung bedarf jedoch noch der experimentellen Prüfung.

Der einheitliche Verlauf der entsprechenden Kurven für RNS und intaktes Virus zeigt bereits, daß der Eiweißanteil des Virus keinen bestimmenden Einfluß auf den Mechanismus der Reaktion hat.

¹ Einer der zahlreichen, inzwischen von MELCHERS isolierten, durch spontane Mutation aus *vulgare* entstandenen Stämme, der durch primäre Chlorosen und schwachgelbe Sekundärsymptome mit kleinen Nekrosen charakterisiert ist.

Um dies zu bestätigen, wurde zunächst die spontane Mutationsrate zu lokal-nekrotisierenden Mutanten auf Java-Tabak sowohl für intaktes *vulgare*-TMV als auch für die daraus präparierte infektiöse RNS bestimmt. Die beiden erhaltenen Raten sind identisch (Tabelle 3). Der gleiche Test wurde in einem anderen Versuch mit nitritbehandeltem *vulgare*, dessen Infektiosität auf etwa 1/e des ursprünglichen Wertes reduziert worden war, durchgeführt (t ungefähr $-\tau$).

Tabelle 3. Vergleich des spontanen mit dem durch Nitrit-Inkubation von intaktem *vulgare*-TMV erhöhten Auftreten lokaler Nekrosen auf Java-Tabak für intaktes TMV und daraus isolierte RNS

Ver- such Nr.	Präparat	Konzentration an TMV bzw. RNS in 10^{-6} g/ml	Java- Nekrosen + Chlorosen je Blatt	Nekrosen je Blatt	Mutations- rate %
1	TMV- <i>vulgare</i> , unbehandelt. . .	0,26	80	0,15	0,187
	RNS aus unbehandeltem <i>vulgare</i>	7,0	111	0,2	0,180
	TMV- <i>vulgare</i> , 20 min mit Nitrit inkubiert	0,7	81,3	4,6	5,65
2	TMV- <i>vulgare</i> , 20 min mit Nitrit inkubiert	0,7	40,7	1,35	3,32
	RNS aus 20 min mit Nitrit in- kubiertem <i>vulgare</i> -TMV . . .	20,0	54	2,12	3,93

Aus einem Teil dieses nitritbehandelten Virus wurde wiederum durch 4maliges Schütteln mit Phenol das Protein entfernt und die erhaltene RNS wie oben getestet. Auch im Falle dieses nitritbehandelten Virus ergeben sich *keine* Differenzen zwischen den Mutationsraten des intakten Virus und der daraus nachträglich präparierten RNS. Die beiden Raten sind untereinander gleich, aber erheblich größer als die Spontanrate des unbehandelten Virus (Tabelle 3). Dies zeigt, daß der beobachtete Effekt auf der Einwirkung des Nitrits auf die RNS des Virus beruht und in seinem quantitativen Ergebnis unabhängig von der Anwesenheit des Virusproteins ist.

c) *Der biologische Beweis für die mutagene Wirkung der Nitrit-Inkubation.* Wie die vorgenommene quantitative Analyse zeigt, folgt die nitritinduzierte Entstehung von Nekrosen auf Java-Blättern Gesetzmäßigkeiten, die eine unmittelbare chemische, und zwar mutagene, Veränderung der RNS an einzelnen Nucleotiden wahrscheinlich machen. Für den Beweis eines wirklich *mutagenen* Effektes war es zusätzlich notwendig, die Entstehung neuer Stämme zu sichern. Dabei mußte vor allem in Übertragungsexperimenten die Stabilität der neu aufgetretenen Merkmale geprüft werden. Außerdem war zu untersuchen, ob neben dem primären Nekrotisierungsvermögen auf Java-Tabak noch andere neue Charaktere infolge der Nitrit-Behandlung auftreten.

Diesen beiden Fragestellungen wurde in einem umfassenderen Abimpfungs-Experiment nachgegangen.

Das Prinzip dieses Experimentes ist die Isolierung von Einzelherden unter Bedingungen, die die Möglichkeit einer subjektiven Selektion ausschließen und die Übertragung des Virus aus diesen Herden auf Pflanzen, deren Symptome nach erfolgter Erkrankung eine möglichst große Zahl von Charakteren des Virus zu beobachten gestatten. Ausgegangen wurde von den Gruppen „96 min nitritinkubierte RNS“ und der Verdünnungskontrolle mit 0,19 γ RNS/ml des in Tabelle 2 wiedergegebenen Versuchs. Die Infektiosität (nach Nekrosenzahl/Xanthi-Blatt) beider ist nahezu identisch und die Zahl der Nekrosen/Blatt (etwa 3) so gering, daß die



Abb. 6a—h. Einige Beispiele von TMV-Stämmen, die nach Inkubation von *TMV-vulgare*-RNS mit Ni entstanden sind und aus Nekrosen von Xanthi-Tabakblättern isoliert wurden. Gesamtübersicht über die gehaltenen Mutanten in Tabelle 4; experimentelle Daten bei Tabelle 2 und Text S. 623 u. 626. — a) systemisch nekrotisierend auf Samsun, Ni 45; b) atypische Einzelform Ni 53; c) ähnlich *vulgare*, doch ohne deutliche nekrotisierend auf Samsun, Ni 20; d) Adernbänderungs-Typ Ni 18; e) mit verstärkten Deformationen, in späteren Stadien Reduktion der Blattspreite bis auf die Mittelrippe, Ni 10; f) atypische Einzelform Ni 12; g) maskierter Stamm Ni 54; h) abgeschwächter Stamm Ni 19



b. 7a—h. Ausgesuchte Beispiele möglichst extremer Variabilität innerhalb einer Kontrollgruppe mit un-
 behandelter RNS. Abimpfungen aus Nekrosen von Xanthi-Tabakblättern. Gesamtübersicht und Vergleich
 nitritbehandelter RNS siehe Tabelle 4 und Abb. 6, experimentelle Daten Tabelle 2 und Text S. 623 u. 626.
 Kontrolle Nr. 63, b) Kontrolle Nr. 101, c) Kontrolle Nr. 109, d) Kontrolle Nr. 75, e) Kontrolle Nr. 111,
 f) Kontrolle Nr. 85, g) Kontrolle Nr. 71, h) Kontrolle Nr. 61

Infektionsherde gut isoliert werden können. Sie wurden ausgeschnitten und in Mikrowebemörsern homogenisiert. Das Homogenat jeder einzelnen Nekrose wurde mit Puffer auf 1 ml verdünnt und die Präparate eingefroren. Am folgenden Tag wurden mit den (wieder aufgetauten) Homogenaten je ein Samsun- und Java-Sämling pro ursprüngliche Xanthi-Nekrose mittels Glasspatel und Karborund inokuliert. Auf diese Weise wurden *alle* Xanthi-Nekrosen der beiden zu vergleichenden Gruppen isoliert, insgesamt 60 aus der „96 min Nitrit-Gruppe“ (sie erhielten die Protokollnummern 1—60) und 65 aus der Verdünnungskontrolle mit 0,19 γ RNS/ml (diese erhielten die Protokollnummern 61—101, 101 a, 102—124).

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 4 und Abb. 6 und 7 zusammengestellt. Man erkennt gegenüber den sehr gleichmäßig angegangenen Kontrollen ein qualitativ und quantitativ völlig anderes Ergebnis bei der nitritinkubierten RNS: In dieser Gruppe sind von 60 Einzelherd-Übertragungen 20 mißlungen, bei den Kontrollen nur eine unter 65; unter den 40 angegangenen Infektionen aus Nekrosen der Nitrit-Gruppe lassen sich nur 7 in den Symptomen nicht von denen der Kontrollen unterscheiden.

Tabelle 4. Übersicht über die nach Prüfung auf Samsun-Tabak und Java-Tabak in nitritinkubierter vulgare-RNS gefundenen, vom unbehandelten Ausgangsmaterial abweichenden Typen (Versuchsdaten siehe Tabelle 2)

Präparat = RNS aus <i>vulgare</i> -TMV		Ver- gleich Abb. 6	96 min mit Nitrit behandelt 20 × 10 ⁻⁶ g RNS/ml		Unbehandelte Verdünnungs- Kontrolle 0,19 × 10 ⁻⁶ g RNS/ml	
Testpflanzen			Samsun- Tabak ¹	Java- Tabak ¹	Samsun- Tabak ²	Java- Tabak
Bezeichnung der Symptom-Typen	nicht angegangene Abimpfungen . . .	—	20	17	1	1
	wahrscheinlich unverändertes Virus. .	—	7	12	64	64
	<i>vulgare</i> -ähnlich, doch ohne wesentliche Deformationen der Blätter	c	5	2	0	0
	Typen mit deutlicher Adernbänderung	d	7	5	0	0
	± maskierte Stämme	g	2	0	0	0
	langsam sich ausbreitende Mosaiktypen	—	3	6	0	0
	abgeschwächte Typen.	h	2	2	0	0
	Stämme mit verstärkten (bis schweren) Blatt-Deformationen ²	e	3	2	0	0
	hell-grüne Mosaikstämme	—	4	1	0	0
	systemisch nekrotisierende Stämme. .	a	2	0	0	0
	atypische Einzelformen	b, f	3	1	0	0
	nur mit Primärinfektionen:	—				
	a) nekrotisierend		1	4	0	0
	b) chlorotisierend.		1	2	0	0
c) schwach chlorotisierend		0	5	0	0	
d) unsicher, ob mit (Primär-) Infek- tion		0	1	0	0	
Summe			60	60	65	65
Durchgeführte Einzelherd-Abimpfungen			60	60	65	65

¹ Ein auf Samsun-Tabak gefundener Symptomtyp muß nicht unbedingt auf Java-Tabak die gleichen Krankheitserscheinungen hervorrufen. Dies gilt besonders für schwache Stämme.

² Reduktion der Blattspreite teilweise bis auf die Mittelrippe. Solch starke Schädigungen zeigen sich erst 2—3 Wochen nach der Infektion der Pflanzen in vollem Ausmaß.

³ Vergleiche Abb. 7.

Diese Ergebnisse blieben nach einer zweiten Übertragung, die zweieinhalb bis drei Wochen später sowohl von den erkrankten Samsun- als auch von den Java-Pflanzen auf junge Samsun-Sämlinge durchgeführt worden war, unverändert. Die nach dieser 2. Übertragung erhaltenen Symptome waren mit denen der Samsun-Pflanzen aus der 1. Übertragung identisch. Die mit Virus-Material von Java-Pflanzen inokulierten Samsun-Sämlinge entwickelten die gleichen Symptome wie die der entsprechenden Parallel-Abimpfungen von Samsun-Tabakpflanzen. Dies beweist, daß die unterschiedlichen Symptome nicht auf physiologisch bedingte Variabilität der Wirtspflanzen, sondern auf genetisch fixierte, neue Charaktere des Virus zurückgeführt werden müssen. — Die Mutationsrate für den Nekrotisierungscharakter unter den Bedingungen dieser Inkubation beträgt 15% (vgl. Tabelle 2). Die allgemeine Häufigkeit von Mutanten erweist sich bei Beurteilung möglichst vieler Phäne — wie in diesem Experiment geschehen — als sehr viel höher. Möglicherweise ergibt eine noch genauere Prüfung, daß 96 min mit Nitrit unter unseren Bedingungen inkubierte RNS gar kein Material mehr enthält, was noch den unveränderten genetischen Charakter des Ausgangsmaterials trägt.

Diskussion

Um die Entstehung von Mutanten *in vitro* nachzuweisen, wurden Bedingungen gewählt, unter denen ein starker Anstieg der durch die Mutanten hervorgerufenen Zahl an Nekrosen auf Java-Tabak erfolgt. Durch diesen Anstieg wächst die Zahl an Mutanten auf das 20fache des Anfangswertes in einem Bereich, in dem die Infektiosität erst auf die Hälfte abgesunken ist. Dies schließt Selektionsvorgänge aus. Auch eine erhöhte Ausprägungswahrscheinlichkeit von Mutanten durch Verdünnung oder Inaktivierung, wie man sie häufig findet (MUNDY 1957a), kann für einen derartigen Anstieg nicht verantwortlich gemacht werden. Die Mutanten wurden also durch die Nitrit-Behandlung erzeugt.

Bei gleichem Anteil veränderter Basen, d. h. nach gleich starker Inaktivierung, z. B. auf jeweils $1/e$, ist der Prozentsatz an Mutanten unter den infektiös gebliebenen Partikeln derselbe für nitritbehandelte isolierte RNS, für nitritbehandeltes Virus und für nachträglich daraus isolierte RNS. Die mutagene Einwirkung erfolgt also nicht auf das Protein und hat nichts mit Aggregationsphänomenen zu tun, die für RNS und TMV sehr verschieden sind; es muß sich vielmehr um chemische Veränderungen der RNS handeln.

Die quantitative Analyse ergibt, daß die Veränderung eines einzelnen in der Kette der 6000 Nucleotide genügt, um eine Mutation hervorzurufen. Zahlreiche, vermutlich Hunderte von Nucleotiden führen bei ihrer jeweiligen Veränderung zu Mutanten. Die genetische Untersuchung ergab, daß in der Tat eine Vielfalt verschiedener, genetisch verankerter Phäne als Folge der Nitrit-Einwirkung auftrat.

Während sich auf Grund der Versuche positiv ergibt, daß die chemische Veränderung der RNS *in vitro* zu Mutanten führt, zeigte sich auch, daß die Entfernung des Proteins aus dem Virus keine Veränderung des Mutationsverhaltens zur Folge hat. Die Spontanrate von Mutationen in Richtung auf den Nekrotisierungscharakter für Java-Tabak ist etwa die gleiche für TMV und RNS (s. Tabelle 3), nämlich unter unseren Bedingungen 0,2%. Abimpfungen

von 65 durch infektiöse RNS auf Xanthi-Tabak hervorgerufenen Einzelherden ergaben ebenfalls keine veränderten Symptome, im Gegensatz zur nitritbehandelten RNS. Die mutagene Wirkung des Nitrits ist, wie schon bemerkt, unabhängig vom Eiweiß. Diese Befunde machen qualitative Angaben in der Literatur schwer verständlich, nach denen Mutationen bei Infektionen mit isolierter RNS häufiger vorkommen sollen. Ebenso unwahrscheinlich ist es, daß RNS durch Kombination mit dem Protein eines anderen TMV-Stammes *direkt* zu genetisch verändertem Virus führen soll (FRAENKEL-CONRAT et al. 1957).

Die spezifische Wirkung des Nitrits liegt in einer chemischen Umwandlung einzelner Basen des intakten NS-Stranges. Im Falle der Änderung von Cytosin in Uracil wird eine Base in eine andere in der RNS ebenfalls natürlich vorkommende Base verwandelt. In diesem Falle ist es denkbar (wenn auch nicht bewiesen), daß sich die im Reagensglas chemisch veränderte RNS bei der Virus-Vermehrung identisch redupliziert. Bei der Reaktion von Adenin und Guanin entstehen Hypoxanthin und Xanthin, die mit keinem der natürlich vorkommenden Purine identisch sind. Hier besteht vielleicht die Möglichkeit, daß bei der Virusvermehrung anstelle der veränderten Basen eine analoge physiologisch vorkommende Base eingesetzt wird, z. B. Guanin anstelle des aus dem Adenin entstandenen Hypoxanthins. Eine Entscheidung zugunsten dieser Möglichkeiten oder anderer, komplizierterer Beziehungen zwischen der veränderten RNS und ihren Vermehrungsprodukten ist derzeit noch nicht möglich. Unabhängig von derartigen speziellen Mechanismen geht aus unseren Untersuchungen hervor, daß der Austausch einer NH_2 -Gruppe gegen eine OH -Gruppe an einer einzelnen Base des RNS-Stranges *in vitro* die Produktion von genetisch verändertem Virus in der Wirtszelle einleitet.

Diese Befunde erleichtern vermutlich den Zugang zu einigen interessanten Problemen. Hierzu gehören u. a. der Mechanismus der RNS-Reproduktion, seine Koppelung mit der Eiweiß-Synthese und die Korrelation zwischen der RNS- und der Protein-Komponente des Virus. Andererseits ermöglichen sie auf einfache Weise die Erzeugung und Auswahl bestimmter Mutanten, z. B. von abgeschwächten Virus-Stämmen. Sie eröffnen auch die Aussicht auf Anhäufung mehrerer Mutationsschritte zu „abgeschwächt“, was auf humanpathogene Viren wie Poliomyelites übertragen bedeutet, daß auch die aktive Immunisierung mit vermehrungsfähigem Virus gegen „Rückmutation“ gesichert werden könnte.

Wir danken Herrn Professor Dr. G. MELCHERS, Herrn Professor Dr. G. SCHRAMM und Herrn Dr. H. SCHUSTER für wertvolle Anregungen und Diskussionen, Herrn Dr. H. G. WITTMANN für seine Unterstützung und Fräulein MARGRET HOLTKAMP, Herrn G. HANSMANN, Fräulein ILSE MÖLLER und Fräulein MARION SCHOLZ für sorgfältige technische Assistenz.

Summary

The infective unit of tobacco mosaic virus (TMV) is its ribonucleic acid (RNA), which is formed by 6000 nucleotides. Treatment with nitrous acid converted adenine, guanine and cytosine into hypoxanthine, xanthine and uracil, respectively. According to SCHUSTER and SCHRAMM most chemical changes of single bases destroy infectivity, some changes might be mutagenic.

In order to detect mutagenic effects the TMV-strain *vulgare* was incubated with nitrous acid (1 m $NaNO_2$ at pH 4,2) and tested on Java-tobacco leaves.

While untreated virus of this type produces only faint *chlorotic* lesions (Fig. 1a), several of the primary infections produced by nitrite-incubated virus are *necrotic* (Fig. 1b, arrows). In studying this in more detail the following results were found:

a) TMV-strain *vulgare* if strongly inactivated by nitrous acid produces many necrotic lesions (table 1, „Java“-columns).

b) If all conditions of the incubation except its duration were kept constant an increase of time of treatment leads to an absolute increase in the number of necrotic lesions per leaf exceeding the spontaneous rate at least 20 times, while the infectivity of the sample was reduced to only $\sim 50\%$ (Table 2). This effect cannot be due to selection of pre-existing mutants but must be attributed to the production of mutants *in vitro*.

c) This production of mutants is independent from the presence of the protein component of the virus (Table 3, Fig. 4): the rate of mutation (= ratio of number of necrotic lesions on Java tobacco leaves to the number of necrotic and chlorotic lesions on these plants) is the same with intact virus treated with nitrite, isolated RNA treated with nitrite, and RNA isolated from nitrite-treated complete virus.

d) The quantitative relation between the induction of mutants by nitrous acid and the duration of treatment of virus or RNA is that of an one-hit reaction (Fig. 4: — theoretical one-hit curve; - - - - theoretical double-hit curve). Thus the necrotic character can appear when only one out of the 6000 nucleotides of the TMV-RNA is altered.

e) So far it can be proved by the symptoms developing on Samsun (= Turkish) tobacco and Java tobacco plants that only a little amount of RNA remains unchanged after treatment in 1 m NaNO_2 solution at pH 4.8 for $1\frac{1}{2}$ hours. Not only the Java-necrotic type but *many* new characters arise (Table 4). Out of 60 local-lesion transfers from Xanthi tobacco, 40 produced infections on Samsun and Java tobacco plants, 20 were lost. Among 65 control transfers of single lesions from Xanthi tobacco only one fails to give an infection. The symptoms of only 7 of the 40 infections obtained from treated RNA seem to be identical with those of the controls. A selection of several virus strains found with nitrite-incubated RNA is shown in Fig. 6. Fig. 7 gives an impression of the uniformity of the controls although the types shown in this figure are selected for greatest differences in their symptoms.

All these experiments show that replacement of one single NH_2 -group by one OH-group *in vitro* can change the genetic character of the whole TMV-RNA molecule.

Literatur

- AUERBACH, CH.: Chemical induced mutations and rearrangements. *Drosophila Information Service* 27, 48 (1943). — AUERBACH, CH., and J. M. ROBSON: Chemical production of mutations. *Nature* (Lond.) 157, 302 (1946). — BENZER, S., and E. FREESE: Induction of specific mutations with 5-bromouracil. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 44, 112 (1958). — FRAENKEL-CONRAT, H., B. H. SINGER and R. C. WILLIAMS: The nature of the progeny of virus reconstituted from protein and nucleic acid of different strains of tobacco mosaic virus. In: *The chemical basis of heredity*, p. 501. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957. — FRIEDRICH-FREKSA, H., G. MELCHERS u. G. SCHRAMM: Biologischer, chemischer und serologischer Vergleich zweier Parallel-Mutanten phytopathogener Viren mit ihren Ausgangsformen. *Biol. Zbl.* 65, 187 (1946). GIERER, A.: Structure and biological function of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus.

Nature (Lond.) **179**, 1297 (1957). — Z. Naturforsch. **13b** (1958 im Druck). — GIERER, A., u. G. SCHRAMM: Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **11b**, 138 (1956). — Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature (Lond.) **177**, 702 (1956). — GOWEN, T. W.: Mutation in *Drosophila*, bacteria and viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **9**, 187 (1941). — HERSHEY, A. D., and M. CHASE: Independent function of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. gen. Physiol. **36**, 39 (1952). — KAUSCHE, G. A., u. H. STUBBE: Über die Entstehung einer mit Röntgenstrahlen induzierten Mutation des Tabakmosaikvirus. Naturwiss. **27**, 501 (1939). — KÖHLER, E.: Über das Auftreten abweichender Varianten bei den Cs-Stämmen des Kartoffel-X-Virus. Arch. Virusforsch. (Wien) **1**, 46 (1939). — Über vergebliche Versuche, beim Tabakmosaikvirus „Mutationen“ in Rohsäften zu erzielen. Z. Pflanzenkrkh. **52**, 392 (1942). — LARSON, R. H., M. A. STAHMANN und J. C. WALKER: The induction of mutants in potato virus X by nitrogen mustard. Proc. 2. Conf. on potato virus diseases. Wageningen: H. Venman & Zonen 1955. — LARSON, R. H., M. A. STAHMANN, J. C. WALKER and R. W. COLBURN: Mutations of potato virus X induced by nitrogen mustard. (Abs.) Phytopathology **42**, 25 (1952). — LATARJET, R.: Mutation induite chez un virus par irradiation ultraviolette de cellules infectées. C. R. Acad. Sci. (Paris) **228**, 1345 (1949). — MELCHERS, G.: Über einige Mutationen des Tabakmosaikvirus und eine „Parallelmutation“ des Tomatenmosaikvirus. Naturwiss. **30**, 48 (1942). — Phytopathogene Viren. Fiat rev. of german science 1939—1946. Biology, part I. Publ. by Office of Military Government for Germany. Wiesbaden: Dietrichsche Verlagsbuchhandlung 1948. — MELCHERS, G., G. SCHRAMM, H. TRURNIT u. H. FRIEDRICH-FREKSA: Die biologische, chemische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Mosaikvirus aus Tomaten. Biol. Zbl. **60**, 524 (1942). — MÜLLER, H. J.: Artificial transmutation of the gene. Science **66**, 84 (1927). — MUNDY, K. W.: Zur Frage des Einflusses von Röntgen- und UV-Strahlen auf die Mutationsrate des Tabakmosaikvirus nach Bestrahlung reiner Präparate. Z. Vererbungslehre **88**, 115 (1957). — Die Abhängigkeit des Auftretens neuer Virusstämme von der Kulturtemperatur der Wirtspflanzen. Z. Vererbungslehre **88**, 407 (1957). — Über die Korrelation zwischen Partikellänge und Infektiosität beim Vergilbungsvirus der Rüben. Z. Naturforsch. **13b**, 19 (1958). — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomen-Mutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **81**, 313 (1943). — SCHUSTER, H., u. G. SCHRAMM: Bestimmung der biologisch wichtigen Einheit in der Ribosennucleinsäure des TMV auf chemischem Wege. Z. Naturforsch. **13b** (1958), im Druck. — SILVESTRI, L.: Bull. I. S. M. **28**, 193 (1949), zit. nach T. F. ANDERSON: Bacteriophages. Ann. Rev. of Microbiology **4**, 21 (1950). — STUBBE, H.: Neue Forschungen zur experimentellen Erzeugung von Mutationen. Biol. Zbl. **60**, 113 (1940). — TAKAHASHI, N. W.: Increasing the sensitivity of the local-lesion method of virus assay. Phytopathology **46**, 654 (1956). — WEIGLE, J. J.: Induction of mutations in a bacterial virus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 628 (1953). — WEIGLE, J. J., and R. DULBECCO: Induction of mutations in bacteriophage T₃ by ultraviolet light. Experientia (Basel) **9**, 372 (1953).

Dr. K. W. MUNDY, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers,
Tübingen, Corrensstr. 41

Dr. A. GIERER, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Melanchthonstr. 38

The Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts

THE RELATION OF CALCIUM AND MAGNESIUM TO CROSSING OVER IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDI* *

By

R. P. LEVINE and W. T. EBERSOLD

(Eingegangen am 7. Juni 1958)

One approach to an understanding of the mechanism of crossing over is through the modifying effect of certain external agents which alter the frequency of the process in a predictable fashion. A major objection to such an approach is that the mode of action of these agents is often complex or unknown. In addition, their action on the process of crossing over may be an indirect one having little bearing upon the mechanism of the process. This may be said for the action of such agents as temperature shocks, x-radiation, ultra-violet light, and chemical mutagens. The findings of STEFFENSEN (1953, 1955, 1957) that deficiencies of the divalent cations calcium and magnesium bear a definite relation to increased chromosome breakage in *Tradescantia* suggested that a new and profitable approach to crossing over might be attempted through an analysis of the effects of these ion deficiencies. Several authors have reported effects of a chelating agent on crossing over in *Drosophila melanogaster* (LEVINE 1955; STEFFENSEN, ANDERSON and KASE 1956; and KAUFMANN, GAY and McELDERRY 1957). EISENSTARK and KIRCHNER (1957) have stated that a chelating agent is capable of altering the frequency of gene recombination in *Escherichia coli* and the frequency of transduction in *Salmonella typhimurium*. KAUFMANN and McDONALD (1956) and LEVINE (1956) have criticized some of these investigations, particularly those with *Drosophila* where there is a question of the direct role of the chelating agent when there are a great number of steps between the chelating agent in the medium and the cells undergoing meiosis. Furthermore, in addition to the chelating agent, crossing over in *Drosophila* seems to be sensitive to other substances placed in the medium (KAUFMANN, GAY and McELDERRY 1957).

The recent investigation by EVERSOLD and TATUM (1956) utilizing the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in which rigid control of the external medium is possible might be considered to be the most significant one dealing with the relation of metallic ions to crossing over. In their experiments they found that the chelating agent ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) could induce a ten-fold increase in crossing over between the linked genes *arginine-1* and *arginine-2*. They also reported that EDTA was capable of removing significant amounts of calcium and magnesium from this organism while water did not do so. Furthermore, following EDTA treatment, addition of high concentrations of calcium and magnesium restored the crossover frequency to the control value.

* This work was supported by the United States Public Health Service (Grant No. E1421) and the National Science Foundation (Grant No. G2812).

In view of the results of EVERSOLE and TATUM, plus the fact that crossing over in *C. reinhardi* can be studied with great ease and with control of the ionic composition of the medium, an effort was made to repeat and extend their experiments. The purpose of this paper is to report the results of this effort.

Material and Methods

Because of certain differences in our results as compared with those of EVERSOLE and TATUM it is necessary to give fairly detailed information on the material and methods.

1. *The mutant stocks.* Crossing over in all of the experiments to be described here, as well as those of EVERSOLE and TATUM, was measured in crosses of *arginine-1* $\times$ *arginine-2* (*arg-1* $\times$ *arg-2*) located approximately six units apart. These mutants were obtained by U-V irradiation (EBERSOLD 1956, EVERSOLE 1956). The wild type stock from which they were derived was collected in Amherst, Massachusetts by Professor G. M. SMITH.

2. *Media.* Four kinds of media were employed in the experiments reported here: 1) minimal medium, defined as that which supports the growth of wild type but not the biochemical mutants, 2) minimal medium enriched with yeast extract and sodium acetate, 3) minimal medium supplemented with arginine, and 4) LUDOX-minimal medium in which Ludox, a commercial silica gel preparation free of calcium, is substituted for agar. The composition of media 1, 2, and 3 is given in Table 1.

Table 1. *Media*

1. Minimal Medium		2. Yeast Extract-Acetate Medium	
Beijerinck's solution ^a	10 ml	Yeast extract	0.4 gm
Phosphate buffer ^b	10 ml	Sodium acetate	0.2 gm
Trace element solution ^c	0.1 ml	Agar	2 gms
Agar	2 gm	Minimal medium.	100 ml
Ion-free water	80 ml		

3. Minimal supplemented with Arginine	
Arginine (0.01 mg/ml)	1 ml
Minimal medium	100 ml

a. Beijerincks solution (See Bold 1942): NH_4NO_3 , 0.5 gm; K_2HPO_4 , 0.2 gm; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 gm; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 gm; and H_2O , 1000 ml.

b. Phosphate buffer: K_2HPO_4 , 7.17 gm; KH_2PO_4 , 3.63 gm; and H_2O , 1000 ml.

c. Trace element solution (after HUTTNER et al. 1950): EDTA, 5.00 gm; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.20 gm, H_3BO_3 , 1.14 gm; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.51 gm; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.49 gm; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16 gm, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.16 gm; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.11 gm; and H_2O , 100 ml.

The minimal medium used by EVERSOLE and TATUM differs from that given here in that it contains 100 times the concentration of NH_4NO_3 and 25 times the concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The minimal of EVERSOLE and TATUM was used in our experiment given as item 2 in Table 2. In place of the phosphate buffer which gives a pH of 6.8 they used Tris buffer (tris-hydroxymethyl-amino methane) at a concentration of 0.5 M giving a pH of 8.3. This buffer was used in certain of the experiments reported here and is indicated in the summary of results in Table 2.

3. *Methods.* In our experiments on the effects of EDTA as in those of EVERSOLE and TATUM, cells of opposite mating type were grown on a minimal medium supplemented with yeast extract and sodium acetate. At an appropriate time (4 to 5 days later) they were removed and suspended separately in 10^{-4} M EDTA and in distilled water as a control. Treatment time varied from 6 to 25 hours. At the end of the treatment period the experimental cell suspensions were combined for mating. At the same time the control suspensions were combined. After mating, the zygotes were placed on a minimal medium for maturation. This method of handling zygotes is that of EVERSOLE and TATUM and it was followed in our experiments numbered 2, 3 and 4 in Table 2. There seemed to us to be one serious inconsistency in this procedure. Immediately after EDTA-treated cells were combined they were

Table 2. *Per Cent of Recombinants Following EDTA Treatment or Ion Deficiency*

Experiment	Treatment	No. Zygotes	No. Re- combinants	(%) Re- combinants
(From EVERSOLE, R. A., and E. L. TATUM 1956)	EDTA (25 hrs)	83	49	59.04
	H ₂ O (24 hrs) EDTA (24 hrs) p _H 6.8 } { (10 ⁻⁴ M)	863 4489	59 395	6.84 8.80
	H ₂ O (24 hrs) EDTA (24 hrs) p _H 8.3 } {	195 120	12 8	6.15 6.67
	H ₂ O (25 hrs). EDTA (25 hrs) (10 ⁻⁴ M) p _H 8.3 } Na Citrate (25 hrs) (10 ⁻⁴ M) }	2342 2212 2085	169 125 140	7.22 5.65 6.71
	Ludox substituted for agar in all treatments. p _H 6.8			
	Control	2139	182	8.50
	Zygotes matured on 0 Ca and Mg. . .	1069	99	9.26
	EDTA (24 hrs)	4537	316	6.96
	EDTA (24 hrs) Zygotes matured on 0 Ca and Mg.	4151	385	9.27
	Cells grown in liquid minimal less Ca for five weeks Then plated to minimal less Ca in Ludox for 4 days. Then mated. Zygotes plated to minimal less Ca in Ludox, p _H throughout 6.8.	1175	78	6.64

placed on minimal medium which contains calcium and magnesium. There is no reason why this calcium and magnesium is not directly available to newly formed zygotes, unless the cell membrane or wall becomes impermeable immediately to those ions. Therefore, in certain of our experiments zygotes were washed three times in ion-free water and were matured on medium in which purified Ludox was substituted for agar and to which no calcium or magnesium was added.

Following maturation the zygotes were plated on minimal plus arginine medium for germination. After about 72 hours the resulting colonies were replica-plated (LEDERBERG and LEDERBERG 1952) using filter paper to minimal and to minimal plus arginine media. The frequency of crossing over was calculated by dividing the number of wild type recombinants recovered on minimal by the total number of colonies which appeared on minimal plus arginine medium.

A similar experiment was carried out using cells of opposite mating type which had been maintained in a calcium free medium through several transfers over a period of five weeks. Plating onto Ludox medium was necessary in order to obtain cells which were sexually competent. Following mating, the procedure was identical with that just described.

EVERSOLE and TATUM reported that EDTA was capable of removing significant amounts of both calcium and magnesium from gametes of *C. reinhardtii*. Since results from our work were not in agreement with theirs it was necessary to determine whether or not the EDTA treatment in our experiments had indeed bound and removed calcium from cells of the *arg-1* and *arg-2* genotypes. Accordingly, experiments were done in which cells were transferred from an agar medium to liquid medium containing the isotope Ca⁴⁵. The initial activity of the medium was determined and after four or five days growth the cells were removed and the activity of the medium ascertained again. The cells were washed until no change could

be recorded in the activity of the wash water. Next they were divided into two equal parts. Following this, one part was suspended in ion-free water and the other in 10^{-4} M EDTA where they remained (in the light) for twenty-four hours. This treatment is comparable to that used in the crossover experiments. After 24 hours the cell suspensions were centrifuged, the water and EDTA solution were removed, and the activities of the two along with several washes were compared.

Results

The results of the crossover experiments are given in Table 2. Item 1 in the table is an example of data from EVERSOLE and TATUM. Items 2-6 summarize the results obtained in our experiments. None of our experiments, whether they be EDTA treatments at p_H 6.8 or 8.3 or with calcium deficient cells give any indication of a ten-fold increase in crossing over as compared with controls.

Table 3. Uptake of Ca^{45} by Cells of *arg-1* (+) and Ca^{45} Removed by EDTA or Water

	counts/min/0.1 ml
1. Medium before inoculation.	2841
2. Medium after five days of cell growth	2337
3. Ca^{45} uptake by cells	504
4. Ca^{45} removed from cells by ion-free water	344
5. Ca^{45} removed from cells by 10^{-4} M EDTA	352
	Per cent
6. Ca^{45} removed by ion-free water.	68.2
7. Ca^{45} removed by 10^{-4} M EDTA	69.8
8. From EVERSOLE and TATUM (1956)	
Micrograms of Ca per mg dry weight of control cells	645
Micrograms of Ca per mg dry weight of EDTA treated cells .	490
Per cent difference between control and EDTA treated cells .	24

The results of the study of the removal of radioactive calcium by EDTA are given in Table 3. Item 8 in the table refers to data of EVERSOLE and TATUM. Their calcium determinations were based on a flame photometric method while ours were done, as pointed out in the previous section, by an isotope technique utilizing the measurement of the uptake and removal of Ca^{45} . It can be seen that with the isotope method there is no indication for a preferential removal of calcium by the chelating agent.

Discussion

Though the ionic environment may play a role in the stability of chromosome (LEVINE 1956) its role in crossing over in *C. reinhardi* is not revealed by the treatment of gametes with a chelating agent or by growing cells in a calcium deficient medium. In addition, no evidence was found for the preferential removal of calcium from *C. reinhardi* by EDTA. Thus, the data given in Tables 2 and 3 are not in agreement with those of EVERSOLE and TATUM. It is difficult to rationalize the discrepancies between their work and the work presented here. The sample sizes were quite small in the EVERSOLE and TATUM experiments and the larger samples in the present work are most likely a more adequate measure of the frequency of crossing over. The p_H difference of 6.8 against 8.3 cannot be used as a basis for difference since even at p_H 8.3 crossing over was found to be normal. The mutant stocks of *arg-1* and *arg-2* have the same origin, and on

might assume that any differences in genetic background were not sufficient to give the great difference in crossover frequency recorded in the two sets of data. It is true that the experiments were carried out in different laboratories and subject to local differences in technique but here every attempt was made to pattern each experiment as closely as possible after the published information given by EVERSOLE and TATUM.

The results of our experiments justify one conclusion. There is no evidence that alteration of an ionic environment either by a chelating agent or a calcium deficiency causes any significant alteration in the frequency of crossing over between the loci *arg-1* and *arg-2* in *C. reinhardtii*.

Literature

BOLD, H. C.: The cultivation of algae. Bot. Review 8, 69 (1942). — EBERSOLD, W. T.: Crossing over in *Chlamydomonas reinhardtii*. Amer. J. Bot. 43, 408 (1956). — EVERSOLE, R. A.: Biochemical mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Amer. J. Bot. 43, 404 (1956). — EVERSOLE, R. A., and E. L. TATUM: Chemical alteration of crossing over frequency in *Chlamydomonas*. Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 42, 68 (1956). — HUTTNER, S. H., L. PROVOSOLI A. SCHATZ and C. P. HASKINS: Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. Proc. Amer. phil. Soc. 94, 152 (1950). — KAUFMANN, B. P., HELEN GAY and MARY J. McELDERRY: Effect of ribonuclease on crossing over in *Drosophila*. Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 43, 255 (1957). — KAUFMANN, B. P., and MARGARET R. McDONALD: Organization of the Chromosome. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 21, 233 (1956). — LEDERBERG, J., and E. M. LEDERBERG: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. 63, 399 (1952). — LEVINE, R. P.: (1) Chromosome structure and the mechanism of crossing over. Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 41, 727 (1955). — (2) Chromosome organization and gene recombination. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 21, 247 (1956). — STEFFENSEN, D.: (1) Induction of chromosome breakage at meiosis by a magnesium deficiency in *Tradescantia*. Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 39, 613 (1953). — (2) Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency. Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 41, 155 (1955). — (3) Effects of various cation imbalances on the frequency of x-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. Genetics 42, 239 (1957). — STEFFENSEN, D., L. ANDERSON and S. KASE: Crossing over studies with *Drosophila* and maize. Genetics 41, 663 (1956), Abstr.

Dr. R. P. LEVINE and Dr. W. T. EBERSOLD, Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts (USA)

QUALITATIVE, QUANTITATIVE UND JAHRESZEITLICHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN CHROMOSOMALEN POLYMORPHISMUS NATÜRLICHER POPULATIONEN VON *DROSOPHILA SUBOBSCURA* COLL. IN DER UMGEBUNG VON WIEN

Von

ELFRIEDE KUNZE-MÜHL, EVA MÜLLER und DIETHER SPERLICH

(Eingegangen am 14. Mai 1958)

Die bisherigen Arbeiten über *Drosophila subobscura* zeigen, daß diese in Europa und den angrenzenden Gebieten Asiens allgemein verbreitete Art hochpolymorph in der Struktur aller ihrer 5 langen Chromosomen ist. Die geographische Verteilung der Strukturtypen ist weitgehend einförmig. Nur wenige Strukturtypen scheinen für einzelne Areale endemisch zu sein, sehr viele aber kommen an allen untersuchten Standorten vor (RICHTER und HÜNDLER 1956, STUMM-ZOLLINGER 1952). STUMM-ZOLLINGER (1952) führte quantitative Analysen an Standorten in der Schweiz, Frankreich und Portugal durch, wobei auch jahreszeitliche Unterschiede geprüft wurden. Über eine weitere Standortsanalyse berichtet GOLDSCHMIDT (1956) aus Israel. Merkliche Häufigkeitsunterschiede der Strukturtypen scheinen nur in einzelnen Randpopulationen aufzutreten (STUMM-ZOLLINGER 1952, GOLDSCHMIDT 1956). Populationskastenversuche zeigen, daß strukturell heterozygote Individuen den homozygoten überlegen sind (SPERLICH 1958).

In der vorliegenden Arbeit soll über qualitative und quantitative Strukturanalysen an Populationen zweier benachbarter Standorte in der Nähe von Wien berichtet werden. An einem dieser Standorte wurde außerdem eine periodische Untersuchung der Strukturtypenhäufigkeit durch 2 Jahre durchgeführt. Die beiden Fangplätze weisen trotz geographischer Nachbarschaft wesentliche ökologische Unterschiede auf. Der Standort „Kahlenberg“ liegt in 470 m Höhe außerhalb des verbauten Stadtgebietes. Es wurde an verschiedenen Stellen eines Buschwaldes geködert. Der kleine Waldbestand ist durch eine etwa 150 m breite Wiese von der nächsten menschlichen Behausung getrennt und schließt nach Westen zu an das große Waldgebiet des Wienerwaldes an. An diesem kühlen, schattigen Standort überwiegt im allgemeinen während des ganzen Jahres *D. subobscura*, während die domestizierte *D. melanogaster* dort nur sehr selten vorkommt. Der Standort „Schafberg“ hingegen liegt in einem besiedelten Vorort Wiens zwischen Wein- und Obstgärten auf einem stark besonnten Südhang. Die Lebensbedingungen für *Drosophila* sind hier besonders günstig, da in dieser Siedlung während der ganzen Vegetationsperiode Gemüse- und Obstabfälle auf zahlreichen Komposthaufen gesammelt werden. Dementsprechend ist hier *D. melanogaster* die vorherrschende Art, jedoch ist auch *D. subobscura*, besonders in den kühleren Perioden, reichlich vertreten.

Auf dem Kahlenberg wurden in der Zeit von Ende Juni bis Anfang September 1957 wiederholt Fänge durchgeführt. Als Ködergläser dienten normale mit Papiertrichtern versehene *Drosophila*-Kulturf Flaschen, die eine gärende Ködermasse aus Kleie, Hefe und etwas

Zucker enthielten. Diese Gläser wurden vor Regen und starker Sonnenbestrahlung geschützt an Bäumen und Sträuchern in etwa 1 m Höhe aufgehängt. Mit dieser Fangmethode wurden hauptsächlich Weibchen gefangen, die zur Eiablage in die Gläser hineingekrochen waren. Für die Untersuchung der Population des Standortes Schafberg, die in erster Linie saisonbedingte Schwankungen der Strukturtypenhäufigkeit aufdecken sollte, war es aber notwendig die Nachkommenschaft von Männchen zu analysieren und daher mußte die bisherige Fangmethode geändert werden. Als besonders günstig erwies sich eine von BURLA (1951) beschriebene Sammelmethode, die etwas vereinfacht angewendet wurde. Mit einem Gemisch von geriebenen Äpfeln, Bier, Hefe und Zucker beschickte große Kübel wurden in einem Obstgarten auf einer Fläche von 100 m² regengeschützt verteilt. Zum Abfangen der Fliegen dienten trichterförmige Netze, an deren kleinerer Öffnung ein *Drosophila*-Kulturglas befestigt wurde. Die größere Öffnung der Netze wurde rasch über die Kübel gestülpt, so daß die durch Beklopfen der Fangeimer aufgeschreckten Fliegen in die Kulturf Flasche hineinfliegen mußten. Es wurde innerhalb von je 10 Tagen in den Monaten August 1954, Oktober 1954, Mai 1955 und August 1955 gefangen.

Die zytologische Analyse der Populationen beider Standorte erfolgte an Hand von Dauerpräparaten in Euparal nach Färbung in 2%igem Orcein + 60%igem Eisessig. Alle Kulturen wurden zunächst bei der Optimaltemperatur von 18° C gehalten und kurze Zeit vor der Verpuppung der Larven kühler gestellt und mit Frischhefe versehen. Dadurch wurden die Larven gemästet, ihre Entwicklungsdauer verlängert und somit eine optimale Ausbildung der Speicheldrüsenchromosomen erzielt.

Die Lokalisation der beobachteten Inversionen erfolgte an Hand der von MAINX, KOSKE und SMITAL (1953) veröffentlichten Chromosomenkarte. Für die Bezeichnung der Inversionen und Strukturtypen wurden die von KUNZE-MÜHL und SPERLICH (1955) eingeführten Symbole verwendet.

Standortsanalyse Kahlenberg

An diesem Standort wurden im Laufe des Sommers 1953 46 Weibchen gefangen und einzeln angesetzt. In derselben Zeit konnten nur 18 Männchen geködert werden, von denen jedes mit Weibchen des Standardstammes Küsnacht gekreuzt wurde. Der Stamm Küsnacht ist in allen Chromosomen strukturell homozygot (MAINX, KOSKE und SMITAL 1953), daher gibt die chromosomale Struktur der ersten Filialgeneration dieser Kreuzung Aufschluß über die der Väter. Aus der Nachkommenschaft jedes Weibchens wurden durchschnittlich 15, aus den Kreuzungen der Wild-Männchen mit Küsnacht-Weibchen je 9—14 Präparate analysiert.

Insgesamt wurden aus der Nachkommenschaft der 46 aus der Natur gefangenen Weibchen 683 Larven untersucht. Die Häufigkeit der Inversionsheterozygoten ist in Tabelle 1 angegeben. Die verschiedenen homozygoten Zustände der Chromosomen A, U, E und O wurden nicht unterschieden, da die sehr komplexe Natur und Mannigfaltigkeit der Strukturtypen dieser Chromosomen eine diesbezügliche Feststellung sehr erschwert. Für das I-Chromosom, bei dem die Analyse der homozygoten Zustände I_1/I_1 und I_{st}/I_{st} an Hand der Bandscheibenfolge relativ leicht durchgeführt werden kann, ist deren Häufigkeit in Tabelle 1 angeführt. Die Angaben für das A-Chromosom beziehen sich nur auf die weibliche Nachkommenschaft, da im männlichen Geschlecht Hemizygotie vorliegt. Wie Tabelle 1 zeigt, konnten für das A-Chromosom 3 verschiedene Strukturtypen gefunden werden, für das I-Chromosom 2, für das U-Chromosom 5, für das E-Chromosom ebenfalls 5 und für das O-Chromosom 8. Einer der in der Tabelle angeführten Strukturtypen, nämlich E_{1+2+13} (vielleicht auch E_{13}), wurde an diesem Standort erstmalig gefunden, ist aber bereits von KUNZE-MÜHL und

SPERLICH (1955) beschrieben worden. Weiters ist aus Tabelle 1 ersichtlich, daß für jedes Chromosom ein heterozygoter Zustand weitaus häufiger ist als die übrigen. A_1/A_{St} und I_1/I_{St} erreichen nahezu eine Häufigkeit von 50%. Im

Tabelle 1. Häufigkeit der gefundenen heterozygoten Zustände in Prozenten (Gesamtzahl der untersuchten Larven = 683)

Chromosomen	Heterozygoter Zustand	Häufigkeit
A	A_1/A_{St}	49,70
	A_2/A_{St}	1,75
	A_1/A_2	10,82
I	I_1/I_{St}	45,97
	I_1/I_1	4,25
	I_{St}/I_{St}	49,78
U	U_1/U_{St}	0,29
	U_{1+2}/U_{St}	19,32
	U_{1-2+6}/U_{St}	21,96
	U_{1+2+8}/U_{St}	1,46
	U_{1+2+6}/U_{1+2}	4,98
	U_{1+2+8}/U_{1+2}	0,73
E	E_{1+2}/E_{St}	2,90
	E_{1+2+9}/E_{St}	5,56
	E_8/E_{St}	27,81
	E_{1+2+13}/E_{St}	1,31
	E_{1+2}/E_8	3,04
	E_{1+2+9}/E_8	2,32
O	O_{3+4}/O_{St}	17,42
	O_{3+4+8}/O_{St}	1,90
	O_{3+4+1}/O_{St}	2,05
	O_{3+4+22}/O_{St}	0,73
	O_5/O_{St}	1,61
	O_6/O_{St}	8,14
	O_{15}/O_{St}	0,73
	O_{3+4}/O_5	,02
	O_{3+4}/O_6	3,51
	O_{3+4}/O_{15}	1,31
	O_{3+4}/O_{3+4+8}	0,44
	O_{3+4+22}/O_6	0,29

E-Chromosom überwiegt E_8/E_{St} mit 27,81%, im O-Chromosom O_{3+4}/O_{St} mit 17,42%. Nur im U-Chromosom treten 2 Kombinationen, nämlich U_{1+2}/U_{St} (19,32%) und U_{1+2+6}/U_{St} (21,96%) mit nahezu der gleichen Häufigkeit auf, während auch hier alle übrigen heterozygoten Zustände wesentlich seltener sind.

In Tabelle 2 sind die Frequenzen aller Heterozygoten denen der Homozygoten gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß für alle Autosomen mit Ausnahme des O-Chromosoms Homozygotie und Heterozygotie ungefähr gleich häufig sind. Im O-Chromosom wäre auf Grund des hochgradigen Polymorphismus ein Überwiegen der Heterozygoten zu erwarten. Hingegen beträgt gerade für dieses Chromosom die Heterozygotenfrequenz nur 39,15%. Dies ist dadurch bedingt, daß, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, O_{St} sehr häufig auftritt, während alle anderen Strukturtypen des O-Chromosoms selten sind. Nur für das I-Chromosom war es möglich die relative Häufigkeit der Strukturtypen direkt zu ermitteln, da nur für dieses Chromosom die homozygoten Zustände unterschieden wurden. Für alle anderen Chromosomen könnte mit Hilfe der Hardy-Weinberg-Formel aus der Häufigkeit der Heterozygoten auf die Struktur-

typenhäufigkeit rückgeschlossen werden. Die Idealverteilung nach HARDY-WEINBERG liegt aber nur dann vor, wenn keine Störung durch selektive Be-

Tabelle 2. Häufigkeit der homozygoten und heterozygoten Zustände in Prozenten (Gesamtzahl der untersuchten Larven = 683)

Zustand	A-Chromosom		I-Chromosom		U-Chromosom		E-Chromosom		O-Chromosom	
Häufigkeit . .	hom.	het.	hom.	het.	hom.	het.	hom.	het.	hom.	het.
	37,73	62,27	54,03	45,97 ₂	51,26	48,74	57,06	42,94	60,85	39,15

vorzugung oder Benachteiligung einer oder mehrerer Kombinationen auftritt. Da für alle bisher untersuchten Strukturtypen von *Drosophila subobscura* der Beweis erbracht werden konnte, daß die Heterozygoten den Homozygoten in künstlichen Populationen selektiv überlegen sind (SPERLICH 1958), kann diese

Berechnung nach HARDY-WEINBERG nicht ohne weiteres angewendet werden. Um festzustellen, ob in der Larvenpopulation noch eine Idealverteilung nach HARDY-WEINBERG vorliegt, wurde die für das I-Chromosom bekannte Verteilung von Homozygoten und Heterozygoten daraufhin überprüft. In Tabelle 3 sind die berechneten Werte den gefundenen gegenübergestellt und mit der χ^2 -Methode getestet. Die Verteilung entspricht also nicht der Verteilung nach HARDY-WEINBERG. Das Überwiegen der Heterozygoten weist darauf hin,

daß schon während der Larvenentwicklung unter den Bedingungen der Kultur selektive Kräfte wirksam gewesen sein müssen. Da auch für die übrigen Chromosomen ähnliche Vorgänge angenommen werden können, wurde auf eine Berechnung der Strukturtypenhäufigkeit in der Nachkommenschaft der aus der Natur gefangenen Weibchen verzichtet.

Für die weiteren Untersuchungen wurden nur die gefangenen Männchen verwertet, um die relative Strukturtypenhäufigkeit zu erfassen, ohne die homozygoten Zustände an Hand der Querscheibenfolge analysieren zu müssen. Die Untersuchung der Nachkommenschaft aus der Kreuzung je eines Wild-Männchens mit virginellen Weibchen des Standardstammes Küsnacht gibt Auskunft über die chromosomalen Strukturverhältnisse des Vaters. Für eine diesbezügliche Untersuchung standen vom Standort Kahlenberg allerdings nur 18 Männchen zur Verfügung. Diese Zahl ist jedoch für eine größenordnungsmäßige Überprüfung der für die Nachkommenschaft der Weibchen gefundenen Strukturtypenhäufigkeit genügend groß.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, ist in allen Chromosomen die Standardanordnung am häufigsten. E_{St} erreicht 75,0%, O_{St} 72,2%, während in den anderen Chromosomen kein Strukturtyp gesichert häufiger als mit 50% auftritt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Angaben für die Nachkommenschaft der Weibchen in Tabelle 1 sehr gut überein. Zusammenfassend kann der Grad des strukturellen Polymorphismus durch die Größe des Heterozygotiegrades und der Inversionsdichte ausgedrückt werden. Unter Heterozygotiegrad wird die durchschnittliche Anzahl der in bezug auf den Strukturtyp heterozygoten Zustände pro

Tabelle 3

Strukturtyp	Gefunden	Erwartet	Differenz	χ^2
Ist/Ist . . .	341	362,0	−21,0	1,2182
Ist I_1 . . .	313	270,5	+42,5	6,6774
$I_1 I_1$. . .	29	50,5	−21,5	9,1535
Insgesamt .	683	683,0	—	17,0491 $p = 0,01-0,001$

Tabelle 4

Chromosom	Strukturtyp	Häufigkeit in %
A	A _{St}	50,0
	A ₁	38,9
	A ₂	11,1
I	I _{St}	55,5
	I ₁	44,5
U	U _{St}	55,5
	U ₁	2,8
	U ₁₊₂	25,0
	U ₁₊₂₊₆	13,9
	U ₁₊₂₊₈	2,8
E	E _{St}	75,0
	E ₁₊₂	5,6
	E ₈	11,1
	E ₁₊₂₊₉	8,3
O	O _{St}	72,2
	O ₃₊₄	8,3
	O ₃₊₄₊₁	2,8
	O ₃₊₄₊₂₂	2,8
	O ₆	11,1
	O ₁₅	2,8

untersuchtem Tier verstanden. Die Inversionsdichte hingegen ist die durchschnittliche Zahl heterozygoter Inversionen pro Individuum. Die folgenden Angaben beziehen sich lediglich auf die Autosomen. Durch Ausschluß des Geschlechtschromosoms werden die Zahlenangaben unabhängig vom Geschlecht der untersuchten Tiere. Es zeigt sich, daß in der untersuchten Larvenpopulation der Heterozygotiegrad 1,76 und die Inversionsdichte 3,18 beträgt. Die maximale Anzahl von 4 heterozygoten Zuständen pro Tier wurde bei 23 von 683 Larven beobachtet. Mehr als 10 heterozygote Inversionen wurden bei keiner Larve beobachtet.

Standortsanalyse und Saisonuntersuchungen Schafberg

An diesem Standort wurden periodisch Stichproben der Wildpopulation untersucht, um jahreszeitliche Schwankungen der Strukturtypenhäufigkeit aufzudecken. Aus den oben angeführten Gründen wurden zur Strukturtypenanalyse nur Männchen verwendet. Im Jahre 1954 wurden Untersuchungen während der Monate August und Oktober durchgeführt, im Jahre 1955 im Mai und

Tabelle 5. *Strukturtypenhäufigkeit in Prozenten*

Chromosom	Strukturtyp	August 1954	Oktober 1954	Mai 1955	August 1955	Durchschnittliche Häufigkeit
A	A _{St}	58,0	66,0	54,3	52,6	57,2
	A ₁	35,5	29,2	34,3	44,7	35,6
	A ₂	6,5	4,8	11,4	2,7	7,2
I	I _{St}	53,1	62,2	55,7	53,9	56,7
	I ₁	46,9	37,8	44,3	46,1	43,3
U	U _{St}	58,1	69,5	76,4	67,1	69,7
	U ₁	3,2	2,4	0,0	5,3	2,2
	U ₁₊₂	14,5	6,1	12,1	14,5	11,8
	U ₁₊₂₊₆	19,4	20,7	10,0	11,8	14,4
	U ₁₊₂₊₇	3,2	0,0	0,0	1,3	0,8
	U ₁₊₂₊₈	1,6	1,3	1,5	0,0	1,1
E	E _{St}	80,6	68,4	75,7	85,5	76,9
	E ₁₊₂	6,5	6,1	1,4	0,0	3,1
	E ₃	4,9	20,6	16,4	7,9	13,6
	E ₁₊₂₊₉	8,0	4,9	6,5	6,6	6,4
O	O _{St}	82,3	64,6	75,0	77,6	74,4
	O ₃₊₄	6,5	15,9	10,0	9,2	10,6
	O ₃₊₄₊₁	1,6	4,9	2,1	0,0	2,2
	O ₃₊₄₊₂	0,0	2,4	2,2	0,0	1,4
	O ₃₊₄₊₇	0,0	0,0	0,7	0,0	0,3
	O ₃₊₄₊₈	1,6	2,4	0,0	2,7	1,4
	O ₅	3,2	0,0	0,7	1,3	1,1
	O ₆	4,8	8,6	8,6	9,2	8,1
	O ₃₊₄₊₂₂	0,0	1,2	0,7	0,0	0,5
	n	62	82	140	76	360

August. Der Sommer des Jahres 1954 war relativ heiß und trocken, so daß die Population der eher kälteliebenden Art *Drosophila subobscura* sehr dezimiert war. Die Kälteperiode des darauf folgenden Winters setzte erst spät ein und dauerte bis etwa Mitte April 1955 an. Die Stichprobe Mai 1955 dürfte daher der ersten Frühjahrsgeneration entsprechen. Der Sommer 1955 wies keine Extremtemperaturen auf.

Von der Nachkommenschaft der Kreuzungen der gefangenen Wild-Männchen mit Küsnacht-Weibchen wurden je Kreuzung 8 Larven präpariert. Eine falsche Beurteilung der väterlichen Strukturverhältnisse bei Analyse von nur 8 Präparaten ist für ein Chromosom nur in einem von 128 Fällen zu erwarten und kann daher vernachlässigt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Es ist besonders auffällig, daß die Standardstruktur aller Chromosomen in sämtlichen Fangperioden eine Häufigkeit von 50% übersteigt. Die Strukturtypen E_{st} und O_{st} erreichen sogar eine Häufigkeit von 85 bzw. 82%. Andere häufige Strukturtypen sind I_1 und A_1 . Weniger häufig traten U_{1+2} , U_{1+2+6} , E_8 und O_{3+4} auf. Sehr selten dagegen waren die Strukturtypen A_2 , U_1 , U_{1+2+7} , U_{1+2+8} , E_{1+2} , E_{1+2+9} , O_{3+4+1} , O_{3+4+2} , O_{3+4+7} , O_{3+4+8} , O_5 und O_6 . Weiters zeigt die Tabelle, daß sich keine Anhaltspunkte für periodische Häufigkeitsschwankungen finden lassen. Auffällig erscheinen nur die Frequenzunterschiede im E-Chromosom. Zur Überprüfung der Homogenität der Prozentsätze wurde für jedes Chromosom ein χ^2 -Test durchgeführt, dessen Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengestellt sind. Die seltenen Strukturtypen wurden bei der Berechnung zusammengefaßt. Während sich für die Chromosomen A, I, U und O keine signifikante Abweichung von den Durchschnittswerten nachweisen läßt, ergibt sich für das E-Chromosom eine schwache Signifikanz. Es könnten daher die Häufigkeitsunterschiede des Strukturtyps E_8 als Saisonschwankungen gedeutet werden. Im Hinblick auf die Homogenität aller anderen Strukturtypenhäufigkeiten könnte aber auch diese Schwankung zufällig sein. Es soll in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß der Strukturtyp E_8 auch in künstlichen Populationen eine Sonderstellung einnimmt. Seine Frequenz ist im ingezüchteten Laboratoriumsstamm außerordentlich niedrig, steigt aber durch Einkreuzung mit dem Standardstamm Küsnacht wesentlich an (SPERLICH 1958).

Tabelle 6. Homogenitätstest

Chromosom	χ^2	df	p
A	1,7	3	0,7 —0,5
I	1,2	3	0,7 —0,5
U	10,8	6	0,1 —0,05
E	12,9	6	0,05—0,02
O	6,7	6	0,5 —0,3

Für *D. subobscura* wurden bereits von STUMM-ZOLLINGER (1952) jahreszeitliche Untersuchungen durchgeführt. In den von ihr an 4 verschiedenen Standorten untersuchten Populationen traten ebenfalls keine statistisch gesicherten jahreszeitlichen Variationen auf. Allerdings beziehen sich ihre Angaben auf die Häufigkeit heterozygoter Inversionen ohne Rücksicht auf Strukturtypen und Inversionskomplexe und können daher mit unseren aus der Strukturtypenanalyse gewonnenen Ergebnissen nicht ohne weiteres verglichen werden. Immerhin deuten alle bisherigen Ergebnisse darauf hin, daß *D. subobscura* zu den strukturalpolymorphen Arten gehört, deren Strukturtypenhäufigkeit innerhalb einer lokalen Population konstant bleibt. Die mittels der Hardy-Weinberg-Formel errechnete Homo- und Heterozygotenhäufigkeit der Strukturtypen wurde mit den gefundenen Häufigkeitswerten verglichen und die Ergebnisse in Tabelle 7 zusammengestellt. Dabei wurden für die Chromosomen U, E und O die Standardstrukturtypen allen anderen gegenübergestellt. Für das A-Chromosom, das bei den Männchen hemizygot vorliegt, konnte kein Vergleich durchgeführt werden. Die in Tabelle 7 zusammengestellten Werte beziehen sich auf das gesamte Unter-

suchungsmaterial vom Schafberg, wobei die einzelnen Stichproben zusammengefaßt wurden. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der errechneten mit den gefundenen Werten. Auch die Häufigkeitsverteilung in den einzelnen

Tabelle 7. Gefundene und nach
HARDY-WEINBERG erwartete Verteilung
der Strukturtypen bei den Imagines

Chromosom	Strukturtyp	Erwartete Anzahl	Gefundene Anzahl
I	I _{st} /I _{st}	57,1	57
	I ₁ /I _{st}	87,5	90
	I ₁ /I ₁	35,4	33
U	U _{st} /U _{st}	88,5	89
	U _x /U _{st}	74,3	74
	U _x /U _x	17,2	17
E	E _{st} /E _{st}	106,6	108
	E _x /E _{st}	63,0	61
	E _x /E _x	10,4	11
O	O _{st} /O _{st}	99,9	103
	O _x /O _{st}	67,6	66
	O _x /O _x	12,5	11

Tabelle 8
Heterozygotiegrad und Inversionsdichte

	Heterozygotiegrad	Inversionsdichte
August 1954	1,58	3,10
Oktober 1954	1,76	3,54
Mai 1955	1,54	2,87
August 1955	1,61	2,95
Durchschnitt	1,61	3,08

Fangperioden entspricht der Hardy-Weinberg-Verteilung. Selektive Kräfte, die für Verschiebungen des Gleichgewichtes zwischen Homo- und Heterozygoten verantwortlich sind, konnten also nicht nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, daß das gegebene Gleichgewicht den Bedingungen des Standortes optimal entspricht und ein stabiles, adaptives Gleichgewicht darstellt.

Um das Ausmaß des strukturellen Polymorphismus zahlenmäßig erfassen zu können, wurde sowohl der Heterozygotiegrad als auch die Inversionsdichte ermittelt (Tabelle 8). Auch hier beziehen sich die Angaben lediglich auf die Autosomen. Von 180 untersuchten Tieren waren 5 in allen 4 Autosomen heterozygot und erreichten somit den höchstmöglichen Heterozygotiegrad. Die maximale Anzahl von 10 heterozygoten Inversionen wurde bei 2 Tieren beobachtet. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Zahlen der verschiedenen Fangperioden nicht signifikant.

Interchromosomale Kombinationen in natürlichen Populationen

Drosophila subobscura gehört zu den Arten, deren struktureller Polymorphismus durch ein ausbalanciertes Heterosisgleichgewicht aufrechterhalten wird. Die heterozygoten Individuen sind, soweit überprüft, den homozygoten Tieren selektiv überlegen (SPERLICH 1958). Da bei dieser Art alle Chromosomen strukturell heterozygot vorliegen können, erscheint es von Interesse über die interchromosomalen Kombinationen der heterozygoten Zustände und heterozygoten Inversionen Untersuchungen anzustellen. Das vorliegende Zahlenmaterial der Standortanalysen Kahlenberg und Schafberg kann für die Beantwortung folgender 3 Fragen herangezogen werden.

1. Gibt es selektiv bevorzugte Kombinationen zwischen 2 oder mehreren bestimmten heterozygoten und homozygoten Zuständen verschiedener Chromosomen?

Um diese Frage beantworten zu können, wurden aus den häufigeren heterozygoten Zuständen des Materials vom Standort Kahlenberg verschiedene Kombinationsmöglichkeiten zusammengestellt, deren Häufigkeit aus dem Rohprotokoll ermittelt und mit den Erwartungswerten verglichen wurde. Die erwartete Häufigkeit der ausgewählten Kombinationen ergibt sich aus dem Produkt

der Einzelhäufigkeiten der entsprechenden heterozygoten und homozygoten Zustände. So z. B. trat E_8/E_{St} mit einer Häufigkeit von 0,2752 und I_{St}/I_{St} mit einer Häufigkeit von 0,4978 auf. Die erwartete Häufigkeit für die Kombination E_8/E_{St} und I_{St}/I_{St} beträgt daher 0,1369. Demgegenüber wurde diese Kombination mit einer Häufigkeit von 0,1259 gefunden. Auf diese Weise wurden insgesamt 17 verschiedene Kombinationen geprüft; beim Vergleich der gefundenen mit den erwarteten Werten ergab sich in keinem Fall eine gesicherte Abweichung. Es kann daher angenommen werden, daß es keine durch Selektion bevorzugten interchromosomalen Kombinationen gibt.

2. Da bekannt ist, daß von den heterozygoten Zuständen eine positive Selektionswirkung ausgeht, erhebt sich nun die Frage, ob mit der Anzahl der heterozygoten Zustände pro Individuum auch diese positive Selektionswirkung gesteigert wird.

Für diese und die 3. Frage konnte das Material vom Standort Kahlenberg nicht herangezogen werden, da die untersuchte Larvenpopulation nur von 46 Weibchen abgeleitet wurde und die Strukturverhältnisse der Imagines nur von 18 Männchen bekannt waren. Es wurden zunächst die Prozentsätze von homo- und heterozygoten Zuständen für jedes Chromosom gesondert aus dem Rohprotokoll „Schafberg“ ermittelt. Es gibt für die 4 Autosomen insgesamt 16 verschiedene Kombinationen von heterozygoten und homozygoten Zuständen. Für jeden dieser 16 Fälle kann die erwartete Häufigkeit aus dem Produkt der Einzelhäufigkeiten errechnet werden. Innerhalb jeder Klasse mit 0, 1, 2, 3 oder 4 heterozygoten Zuständen wurden die erwarteten Häufigkeitswerte addiert und die so gewonnenen Zahlen mit den gefundenen verglichen und mit dem χ^2 -Test fehlerkritisch geprüft. Es ergab sich in keinem Fall eine signifikante Abweichung.

3. Die Begriffe „heterozygoter Zustand“ und „heterozygote Inversion“ sind nicht gleichwertig und es erscheint daher von Interesse, dieselbe Frage in bezug auf heterozygote Inversionen zu stellen. Aus dem Rohprotokoll „Schafberg“ wurden die beobachteten Häufigkeiten für Tiere mit 0, 1, 2, 3, 4, 5 und mehr als 5 Inversionen ermittelt und in entsprechenden Gruppen zusammengefaßt. Die Erwartungswerte wurden berechnet und mit den gefundenen Zahlen verglichen. In den Gruppen mit 5 und mehr als 5 Inversionen pro Tier sind die gefundenen Werte wohl etwas höher als erwartet, doch läßt sich diese Differenz statistisch nicht sichern ($\chi^2 = 11,4143$, $p = 0,10-0,05$).

Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, daß bei *Drosophila subobscura* keine jahreszeitlichen Schwankungen der Strukturtypenhäufigkeit nachzuweisen sind. Diese Feststellung bestätigt die Beobachtungen von STUMM-ZOLLINGER (1952). Das Fehlen zyklischer Variabilität bei *D. subobscura* ist insofern bemerkenswert, als bei anderen strukturell polymorphen *Drosophila*-Arten deutliche Saisonschwankungen festgestellt wurden. So z. B. konnten bei *D. pseudoobscura* (DOBZHANSKY 1940, 1943, 1947, 1948) und bei *D. funebris* (DUBININ und TINIAKOV 1945, 1946) wiederholt jahreszeitliche Schwankungen der Strukturtypenfrequenz beobachtet werden. Etwas weniger deutlich ist diese Variabilität bei *D. persimilis* (SPIESS 1950) und *D. robusta* (CARSON und STALKER 1949,

LEVITAN 1951). Ähnlich wie *D. subobscura* verhalten sich Populationen von *D. willistoni* (DA CUNHA, BURLA und DOBZHANSKY 1950, TOWNSEND 1957), bei denen nur Andeutungen von periodischen Häufigkeitsverschiebungen gefunden werden konnten. Man könnte annehmen, daß bei den Arten, die in mehreren Chromosomen hochgradigen Polymorphismus aufweisen, Saisonschwankungen gering und daher schwer aufzudecken sind. Für diese Annahme sprechen die Ergebnisse mit den stark polymorphen Arten *D. subobscura*, *D. willistoni* und vielleicht auch *D. robusta*. *D. funebris*, die wohl in mehr als einem Chromosom strukturell polymorph ist, zeigt starke zyklische Schwankungen, allerdings ist der Polymorphiegrad dieser Art wesentlich geringer als der von *D. subobscura* und *D. willistoni*. Auch gegenüber anderen Umwelteinflüssen erweisen sich die Populationen von *D. subobscura* stabil. Der Vergleich der 2 Populationen der geographisch benachbarten, aber ökologisch verschiedenen Standorte Schafberg und Kahlenberg ergibt, daß keine Unterschiede der Heterozygotenfrequenz bestehen. Damit nimmt *D. subobscura* gegenüber anderen *Drosophila*-Arten eine Sonderstellung ein. *D. pseudoobscura* und *D. persimilis* (DOBZHANSKY 1947, 1948, SPIESS 1950) sowie *D. robusta* (STALKER und CARSON 1948) zeigen regelmäßige Häufigkeitsunterschiede der Strukturtypen bei verschiedener Seehöhe der Standorte. Von DUBININ und TINIAKOV (1946) wurden wesentliche Unterschiede des Polymorphiegrades zwischen ländlichen und städtischen Populationen von *D. funebris* beobachtet. Die Feststellung, daß das ausbalancierte Gleichgewicht der Strukturtypenhäufigkeit von *D. subobscura* durch verschiedene Umwelteinflüsse nicht wesentlich verschoben wird, wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt. RICHTER und HÜNDLER (1955) und STUMM-ZOLLINGER (1952) berichten, daß die häufigen Strukturtypen, besonders die Standardstrukturtypen aller Chromosomen über alle klimatisch sehr verschiedenen Untersuchungsareale verbreitet sind und nur ganz wenige Strukturtypen endemisch auftreten. Eine Ausnahme scheint die von GOLDSCHMIDT (1956) untersuchte Grenzpopulation von Israel darzustellen, die gegenüber den europäischen Populationen sowohl qualitative als auch quantitative Strukturunterschiede aufweist. Auch STUMM-ZOLLINGER (1952) stellte einen etwas erhöhten Polymorphismus für westeuropäische Randpopulationen fest. Ähnliche Verhältnisse dürften auch in Populationen der süditalienischen Insel Lipari vorliegen. Die diesbezüglichen Untersuchungen, die in unserem Institut durchgeführt werden, sind allerdings noch nicht abgeschlossen. Selektionswirkungen, die sich in der Verschiebung der Hardy-Weinberg-Verteilung äußern müßten, konnten in der natürlichen Population vom Schafberg nicht festgestellt werden. Die Larvenpopulation, die von den am Standort Kahlenberg gefangenen Wild-Weibchen abgeleitet wurde, zeigte bei der Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes im I-Chromosom ein statistisch gesichertes Überwiegen der Heterozygoten. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Ergebnissen ist darauf zurückzuführen, daß die untersuchte Larvenpopulation im Laboratorium gehalten wurde und daher im Gegensatz zu den untersuchten Imagines vom Schafberg unter Umweltbedingungen aufgewachsen ist, die nicht den natürlichen entsprechen. Es zeigt sich also, daß das Häufigkeitsgleichgewicht der Strukturtypen von *D. subobscura* in der Natur kaum verschoben wird, während sich unter Laboratoriumsbedingungen leicht der Heterosiseffekt nachweisen läßt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Mechanismus, der das Gleichgewicht des Polymorphismus der Strukturtypen aufrechterhält, für *Drosophila subobscura* bei Vergleich mit anderen polymorphen *Drosophila*-Arten dem von *D. willistoni* am ähnlichsten zu sein scheint. Diese beiden Arten stehen in bezug auf Anzahl der Strukturtypen bzw. Inversionen an der Spitze, wobei sich der Polymorphismus auf alle Chromosomen annähernd gleichmäßig verteilt. Beide Arten scheinen durch Änderung der Umweltbedingungen weitgehend unbeeinflussbar zu sein. In der geographischen Verbreitung sind bei diesen Arten endemische Strukturtypen selten, jahreszeitliche zyklische Schwankungen kommen nicht oder nur andeutungsweise vor.

Zusammenfassung

1. Es wurden qualitative und quantitative Strukturanalysen an 2 Populationen von *Drosophila subobscura* durchgeführt, deren Standorte benachbart, aber ökologisch verschieden sind.

2. Beim Vergleich der beiden Populationen ergibt sich kein Unterschied in der Häufigkeit der einzelnen Strukturtypen.

3. Während die Verteilung von Homo- und Heterozygoten der in der Natur aufgewachsenen Imagines des Standortes Schafberg dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entspricht, zeigt die im Laboratorium gezüchtete Nachkommenschaft der am Kahlenberg gefangenen Wild-Weibchen ein Überwiegen der Heterozygoten.

4. Für die Population Schafberg wurden jahreszeitliche Untersuchungen durchgeführt. Zyklische Saisonschwankungen der Strukturtypenhäufigkeit konnten nicht nachgewiesen werden.

5. Beim Vergleich mit anderen *Drosophila*-Arten ergibt sich für *Drosophila subobscura* und *Drosophila willistoni* eine große Übereinstimmung in bezug auf den Polymorphiegrad und das ausbalancierte Gleichgewichtssystem der Strukturtypen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. F. MAINX für die Anregung zu dieser Arbeit und seine Hilfe bei deren Durchführung.

Literatur

- BURLA, H.: Systematik, Verbreitung und Ökologie der *Drosophila*-Arten der Schweiz. Rev. suisse Zool. **58**, 23—175 (1951). — CARSON, H. L., and H. D. STALKER: Seasonal variation in gene arrangement frequencies over a three-year period in *Drosophila robusta* Sturtevant. Evolution **3**, 322—329 (1949). — DA CUNHA, A. B., H. BURLA and TH. DOBZHANSKY: Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. Evolution **4**, 212—235 (1950). DOBZHANSKY, TH.: (1) Studies on the genetic structure of natural populations. Yb. Carn. Inst. **39**, 244—247 (1940). — (2) Genetics of natural populations. IX. Temporal changes in the composition of populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics **28**, 162—186 (1943). — (3) Adaptive changes induced by natural selection in wild populations of *Drosophila*. Evolution **1**, 1—16 (1947). — (4) Genetics of natural populations. XVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. Genetics **33**, 158—176 (1948). — DUBININ, N. P., and G. G. LINIÁKOV: Seasonal cycles and the concentration of inversions in populations of *Drosophila funebris*. Amer. Naturalist **79**, 570—572 (1945). — Structural chromosome variability in urban and rural populations of *Drosophila funebris*. Amer. Naturalist **80**, 393—396 (1946). — GOLDSCHMIDT, E.: Chromosomal polymorphism in a population of *Drosophila subobscura* from Israel. J. Genet. **54**, 474—496 (1956). — KUNZE-MÜHL, E., u. D. SPERLICH: Inversionen und chromosomale Strukturtypen bei *Drosophila subobscura* Coll. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**,

65—84 (1955). — LEVITAN, M.: Response of the chromosome variability in *Drosophila robusta* to seasonal factors in a South-west Virginia wood. *Genetics* **36**, 561—562 (1951). — MAINX, F., TH. KOSKE u. E. SMITAL: Untersuchungen über die chromosomale Struktur europäischer Vertreter der *Drosophila obscura*-Gruppe. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 354—372 (1953). — RICHTER, H., u. M. HÜNDLER: Die geographische Verbreitung der chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 85—92 (1955). — SPERLICH, D.: Modellversuche zur Selektionswirkung verschiedener chromosomaler Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 422—436 (1958). — SRIESS, E.: Experimental populations of *Drosophila persimilis* from an altitudinal transect of the Sierra Nevada. *Evolution* **4**, 14—33 (1950). — STUMM-ZOLLINGER, E.: Vergleichende Untersuchung über die Inversionshäufigkeit bei *Drosophila subobscura* in Populationen der Schweiz und Südwesteuropas. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 382—407 (1953). — TOWNSEND, J.I.: Chromosomal polymorphism in Caribbean island populations of *Drosophila willistoni*. *Proc. Nat. acad. Sci. (Wash.)* **44**, 38—42 (1957).

Dr. ELFRIEDE MÜHL, Institut für allgemeine Biologie,
Wien IX., Schwarzspanierstraße 17

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERBREITUNG DES *SULFUREA*-MERKMALES IN POPULATIONEN VON WILDOENOTHEREN

Von

ADOLF KAPPUS

(Eingegangen am 22. Mai 1958)

A. Einleitung

Oenothera biennis ist von allen im Oberrheingebiet vorkommenden Oenotheren die weitaus häufigste Art. Neben den normalen Pflanzen finden sich gelegentlich einzeln oder in kleinen Gruppen solche mit blaßgelben Blüten, die als „*var. sulfurea*“ bezeichnet werden. Schon DE VRIES (1915) bearbeitete diese Form, und OEHLKERS (1924) gelang durch zahlreiche Kreuzungsversuche die Aufklärung der Vererbungsvorgänge, die immer wieder zur Neuentstehung von *sulfurea*-Mutanten aus gelbblühenden *Oe. biennis* und ebenso aus *Oe. suaveolens* führen: Beide Arten besitzen den Eizellenkomplex *albicans*, der den Faktor *s* für blaßgelbe Blütenfarbe enthält, während die Pollenkomplexe *rubens* in *Oe. biennis* bzw. *flavens* in *Oe. suaveolens* den dominanten Faktor *S* für gelbe Blütenfarbe enthalten. Gelegentlich tritt durch crossing-over der rezessive Faktor *s* in den Pollenkomplex *rubens* bzw. *flavens* über, und es entstehen so Zygoten, die in den Faktoren für ihre Blütenfärbung doppelt rezessiv sind und somit blaßgelbe Blüten entwickeln. Die Anzahl dieser Abweicher im Verhältnis zu den normalen Pflanzen sollte in der vorliegenden Arbeit möglichst genau erfaßt werden. Nebenher ging gleichzeitig noch eine Zählung der *sulfurea*-Pflanzen unter der *Oe. suaveolens*, die im gleichen Gebiet stellenweise ebenfalls recht häufig vorkommt.

B. Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial dienten einige größere Vorkommen von *Oe. biennis*, die an verschiedenen Orten in Mittelbaden im Sommer 1957 durchgezählt wurden. Dabei empfahl es sich, einzeln wachsende *sulfurea*-Pflanzen getrennt von solchen zu zählen, die in mehr oder weniger großer Anzahl nahe beieinander standen und offensichtlich von einer gemeinsamen Mutterpflanze stammten. *Sulfurea*-Mutanten von *Oe. suaveolens*, die im gleichen Gelände vorkamen, wurden ebenfalls auf die gleiche Weise ausgezählt, während die Zahl der normalen gelbblühenden *Oe. suaveolens* nur geschätzt wurde.

C. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Nachforschungen sind in der Tabelle 1, nach Fundorten getrennt, aufgezählt. Hierbei zeigt sich, daß die Verbreitung von *sulfurea*-Mutanten in ihrer Häufigkeit recht unterschiedlich ist: Die einzeln stehenden Exemplare halten überall etwa das gleiche Mengenverhältnis zu den gelbblühenden ein, während in Gruppen wachsende nur an 2 Fundorten beobachtet werden konnten. Bei letzteren handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um die Nachkommenschaft schon früher entstandener *sulfurea* und nicht um erst neu auftretende. Bei *Oe. biennis* als kurzgriffeliger Art findet die Bestäubung der

Tabelle 1

Fundorte	Gelbblühend	sulfurea		
		einzel	in Gruppen	gesamt
Rheinufer Elzmündung-Kehl	748	2	—	2
Gemarkung Altenheim bei Offenburg	1485	2	3; 19	24
Kehler Hafen	5425	6	3; 4	13
Umgebung von Offenburg	660	—	—	—
Verschiebebahnhof Offenburg	1538	2	—	2
Sonstige Fundorte	163	1	—	1
Summe	10019	13	29	42

zwischen den Antheren liegenden Narbe beim Aufreißen der Pollensäcke schon lange vor dem Öffnen der Blüte statt. Auf diese Weise haben die eigenen Pollenschläuche einen großen Vorsprung vor solchen aus dem Pollen benachbarter Pflanzen, der ja erst nach dem Öffnen der Blüten auf die Narbe gelangen kann. So wird der größte Teil der Samenanlagen der *sulfurea*-Pflanzen von eigenen Pollenschläuchen befruchtet, die den Faktor *s* für blaßgelbe Blütenfarbe enthalten, während nur ein geringer Rest von noch nicht befruchteten Samenanlagen von den später nachfolgenden Pollenschläuchen erreicht wird, die den Faktor *S* für gelbe Blütenfarbe enthalten. Aus letzteren entstehen dann Zygoten mit der Kombination *sS* und damit gelbblühende Pflanzen, da *S* dominant ist gegenüber *s*. So wird also eine frei abblühende *Oe. biennis sulfurea* wieder vorwiegend Nachkommen mit der Kombination *ss* = *sulfurea* und nur wenige mit der Kombination *sS* = normale, gelbblühende *Oe. biennis* hervorbringen. Umgekehrt kann natürlich auch der Faktor *s* durch Pollen von *sulfurea*-Pflanzen gelegentlich auf normale *Oe. biennis* gelangen und so bewirken, daß diese neben einer großen Mehrzahl von normalen Nachkommen vereinzelt solche mit blaßgelben Blüten hervorbringen. Auf einen entsprechenden Vorgang geht wahrscheinlich eine *sulfurea* neben 19 gelben *Oe. suaveolens* in einer Wildabsaat von *Oe. suaveolens* zurück, deren Samen 1953 im Kehler Hafengelände geerntet wurden (KAPPUS 1957). In großen, durch viele Generationen sich selbst überlassenen Populationen wird sich mehr oder weniger rasch ein gewisses Zahlenverhältnis von normal gelben einerseits und von *sulfurea* andererseits herausbilden, die dreierlei Herkunft haben können: 1. Neu entstanden durch crossing-over; 2. durch Selbstbestäubung schon vorhandener *sulfurea*; 3. durch Bestäubung normaler *Oe. biennis* mit dem Pollen benachbarter *sulfurea*-Pflanzen. Da die normale *Oe. biennis* im Eizellenkomplex *albicans* ohnehin immer den Faktor *s* enthält, kommt in letzterem Falle der Faktor *s* noch einmal durch den Pollen hinzu, und in der entstehenden doppelt rezessiven Pflanze *ss* wird dann die blaßgelbe Blütenfärbung phänotypisch sichtbar.

Auf genau die gleiche Weise, wie aus der in den Faktoren *s* und *S* heterozygoten *Oe. biennis* durch crossing-over gelegentlich die homozygote Form *ss* = *sulfurea* entsteht, muß sich gelegentlich auch genau umgekehrt die homozygote Form *SS* spontan bilden, und in der „*Oe. biennis München*“ liegt ein derartiger Fall vor. Auch die Wildform von Stockstadt am Main enthält *S* im Eizellen- und im Pollenkomplex gleichzeitig (RENNER 1950). Da jedoch *S* an sich schon dominant gegenüber *s* ist, zeigt die homozygote Form *SS* keine stärkere Gelbfärbung als die heterozygote *sS*. Es wäre jedoch möglich, daß die Blüten

der *SS*-Pflanzen im Sonnenschein langsamer ausbleichen als die normalen mit *sS*. Deshalb wurde während der ganzen Untersuchungen ständig darauf geachtet, ob sich eine derartige Pflanze vielleicht auffinden lasse, aber alle Bemühungen in dieser Richtung blieben ohne jeden Erfolg. Kolorimetrische Untersuchungen an Blütenblättern von *Oe. biennis* München, wildwachsender *Oe. biennis* aus Freiburg und aufgezogener *Oe. biennis sulfurea* aus St. Goar wurden zu spät im Jahr begonnen und blieben daher erfolglos.

Während bei *Oe. biennis* 10019 gelbblühenden Pflanzen 42 *sulfurea* gegenüberstanden, ist bei *Oe. suaveolens* die Häufigkeit der letzteren geringer: Auf schätzungsweise 14000—15000 gelbblühende kamen nur 21 *sulfurea*, und diese wurden ausschließlich im Bereich der Kehler Hafenanlagen gefunden. Dabei zeigte sich eine eigenartige Verteilung: Im Westteil des Hafengeländes kam auf etwa 7000 bis 8000 gelbblühende nur eine einzige *sulfurea*, während in dem Bereich nordöstlich vom Hafenbecken III, der früher noch nie untersucht wurde, 13 *sulfurea* auf etwa 4000 gelbblühende entfielen. Zwei weitere wurden in der Nähe des Bauhofes gefunden, wo schon 1955 2 *sulfurea* beobachtet werden konnten.

Am Steinsporen bei Altenheim, etwa Rh. km 285, wo mehrere Jahre lang *Oe. suaveolens sulfurea* vereinzelt vorkam, waren am 13. 8. 57 zwar noch gelbblühende, aber keine *sulfurea* mehr zu finden. Von hier wurde 1953 *sulfurea* in Kultur genommen und 1957 nochmals die Kreuzung *Oe. (suaveolens sulfurea Steinsporen* $\times$ *Hookeri Freiburg*) aufgezogen, wobei diesmal 27 *albata* 24 *flava* gegenüberstanden, während 1954 auf 20 *flava* keine einzige *albata* entfiel. Diese *albata* hatten die normale Konfiguration 0 14, die *flava* dagegen 4, 4, 2, 2, 2, genau wie *Oe. suaveolens Altenheim* (KAPPUS 1957).

Ein Reinbestand von *Oe. biennis sulfurea* bildete sich schon vor längerer Zeit im Höllental am Bahnhof Hirschsprung vor dem Lokomotivschuppen. Er ist über 1 km vom nächsten Vorkommen gelbblühender *Oe. biennis* entfernt, und damit ist eine Einschleppung von Pollen oder Samen von dorthier recht unwahrscheinlich. 1951 bei seiner Entdeckung umfaßte jener Bestand etwa 120 Pflanzen, seither geht er durch wiederholtes Abmähen mehr und mehr zurück. 1957 wurden jedoch erstmals einige blühende *sulfurea* hinter dem Schuppen beobachtet, wo sie sich in Zukunft wohl ungestört ausbreiten können. Einen ganz ähnlichen Fall beschreibt OEHLKERS schon 1924, wo *Oe. biennis sulfurea* in Kronsberg bei Hannover als isolierter Bestand auftrat und dann als „*Oe. biennis Hannover*“ in Kultur genommen wurde.

Zu erwähnen ist noch die recht große Gruppe von 19 *biennis sulfurea* bei Altenheim. Hier war bei einem Brückenbau im Winter 1955/56 beim Aufschütten der Auffahrt offensichtlich Samen einer 1955 blühenden *sulfurea* neben dem von normaler *Oe. biennis* mitsamt der Erde verfrachtet worden und 1956 gekeimt. Anders ist das Vorkommen von 19 *sulfurea* zwischen 159 gelben an einem neuen Standort nicht erklärbar. Es bleibt abzuwarten, welche Zahlenverhältnisse sich in den kommenden Jahren hier zwischen den beiden Formen herausbilden werden.

D. Diskussion der Ergebnisse

Die Häufigkeit der Varietät *sulfurea* in Wildpopulationen von *Oe. biennis* hatte ich früher nach groben Schätzungen mit 0,1—0,2% angenommen. Die Auszählung im Sommer 1957 ergab dann aber 42 *sulfurea* auf 10019 gelbblühende

Pflanzen, also doppelt so viele wie zunächst angenommen. Es ist jedoch fraglich, ob eine Untersuchung der Bestände an den gleichen Fundorten in einem anderen Jahr nicht zu wesentlich anderen Ergebnissen führen würde. Vor allen Dingen ist zu berücksichtigen, daß von den 42 insgesamt gezählten *sulfurea* nicht weniger als 19, also fast die Hälfte, auf das oben beschriebene Vorkommen bei Altenheim entfallen. Ohne dieses wäre die Häufigkeit der Mutanten tatsächlich nicht viel höher als 0,2%.

Wie groß unter den einzeln wachsenden *sulfurea* die Zahl der durch crossing-over jeweils neu gebildeten tatsächlich ist, läßt sich nicht feststellen, da sie ja, wie auf S. 648 beschrieben, auf 3 verschiedene Arten entstanden sein können und in keiner Weise voneinander zu unterscheiden sind. Nur etwa die Hälfte aller einzeln wachsenden dürfte direkt auf crossing-over zurückgehen, das wären also weniger als 0,1%. DE VRIES (1915) zog die Nachkommenschaft mehrerer reiner Linien von *Oe. biennis*, insgesamt 8500 Pflanzen, auf und erhielt in der Mehrzahl 0,1—0,3%, in einem Falle aber 0,7% *sulfurea*, also sehr unterschiedliche Prozentsätze. In eine ähnliche Richtung deutet ja auch die recht unterschiedliche Häufigkeit von *sulfurea* unter *Oe. suaveolens* im Kehler Hafengebiet.

Zusammenfassung

1. Wildpopulationen von *Oe. biennis* wurden 1957 auf ihren Anteil an *sulfurea*-Mutanten durchgezählt und dabei 42 *sulfurea* auf 10019 gelbblühende Exemplare festgestellt.

2. Auf schätzungsweise 14000—15000 *Oe. suaveolens* kamen nur 21 gezählte *sulfurea*.

3. Durch eine Gruppe von 19 nahe beieinanderstehenden *Oe. biennis sulfurea* dürfte der ermittelte Prozentsatz im vorliegenden Falle etwas höher als normal liegen.

Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS danke ich für sein förderndes Interesse an der vorliegenden Arbeit.

Literatur

KAPPUS, A.: Wilde Oenotheren in Südwestdeutschland. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 88, 38 (1957). — OEHLKERS, F.: Vererbungsversuche an *Oenothera*. III. Das *sulfurea*-Merkmal bei den Oenotheren. Biol. Zbl. 44, 1 (1924). — RENNER, O.: Europäische Wildarten von *Oenothera* II. Ber. dtsch. bot. Ges. 63, 5 (1950). — VRIES, H. DE: The coefficient of mutation in *Oenothera biennis* L. Bot. Gaz. 59 (1915).

Dr. ADOLF KAPPUS,

Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzleweg 9/11

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Kühn, Tübingen

CHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN VERSCHIEDENEN GENOTYPEN VON *PLODIA INTERPUNCTELLA* IM VERGLEICH MIT ANDEREN SCHMETTERLINGSARTEN

Von

ELISABETH MÖHLMANN

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Juni 1958)

Einleitung

Seitdem erstmalig chromatographische Methoden zur Untersuchung genabhängiger chemischer Stoffe an *Drosophila* (HADORN und MITCHELL 1951) und an *Ephesia* (HADORN und KÜHN 1953) angewandt wurden, ist dieses Verfahren bei zahlreichen Arten und Mutanten einer Art durchgeführt worden, um genabhängige stoffliche Unterschiede festzustellen. Besonders häufig wurde der Gehalt an fluoreszierenden und ninhydrin-positiven Stoffen bei Augenfarbmутanten geprüft und dabei festgestellt, daß bei diesen nicht nur der Stoffgehalt der Augen, sondern auch der Gesamtstoffwechsel betroffen ist.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist die Untersuchung von Stämmen der Obstmotte, *Plodia interpunctella*, die jeweils durch bestimmte Flügelfärbung und -zeichnung gekennzeichnet sind. Die Versuche umfassen sowohl Flügel als auch Körper dieses Kleinschmetterlings. Die Köpfe werden in dieser Arbeit nicht behandelt. Sie werden an anderer Stelle ausführlich beschrieben (DE ALMEIDA, in Vorbereitung). Zum Vergleich werden 13 Arten aus verschiedenen Schmetterlingsfamilien herangezogen.

Nach SCHWARTZ (1953) werden die verschiedenen Stämme von *Plodia* in fortlaufender Reihe mit Zahlen als Stamm 1, 2, 3 usw. bezeichnet (Abb. 1). Der Stamm 1 gilt als Wildform. Die übrigen Stämme unterscheiden sich von diesem in Flügelfarbe, Flügelmuster oder Augenfarbe. Die von mir untersuchten Stämme haben alle, mit Ausnahme von Stamm 13, die Augenfarbe der Wildform.

Im Flügelmuster sind das Farbsystem und die schwarzen Zeichnungssysteme zu unterscheiden (SCHWARTZ 1953). Das Farbsystem ist unabhängig von der schwarzen Musterung. Es besteht in einer Rottfärbung des distalen Flügelabschnittes (Abb. 1, Stamm 1). Die „proximale Querbinde“ bildet im Normalfall die Grenze zwischen dem roten distalen und dem gelblich weißen proximalen Flügelteil. An der Basis und am Vorderrand sind auch im hellen Proximalteil rote Schuppen eingestreut.

Die mit *g* bezeichnete Mutante (SCHWARTZ 1953) hat anstatt roter gelbe Flügelfarbe. Sie tritt auf in den Stämmen 4, 5, 6, 11 und 13. Die roten und die gelben Stämme unterscheiden sich in der Ausbildung der schwarzen Zeichnungssysteme. Die schwarzen Schuppen können vollkommen fehlen; die Flügel sind im Distalteil ganz rot (Stamm 2) oder ganz gelb (Stamm 4). Im Gegensatz

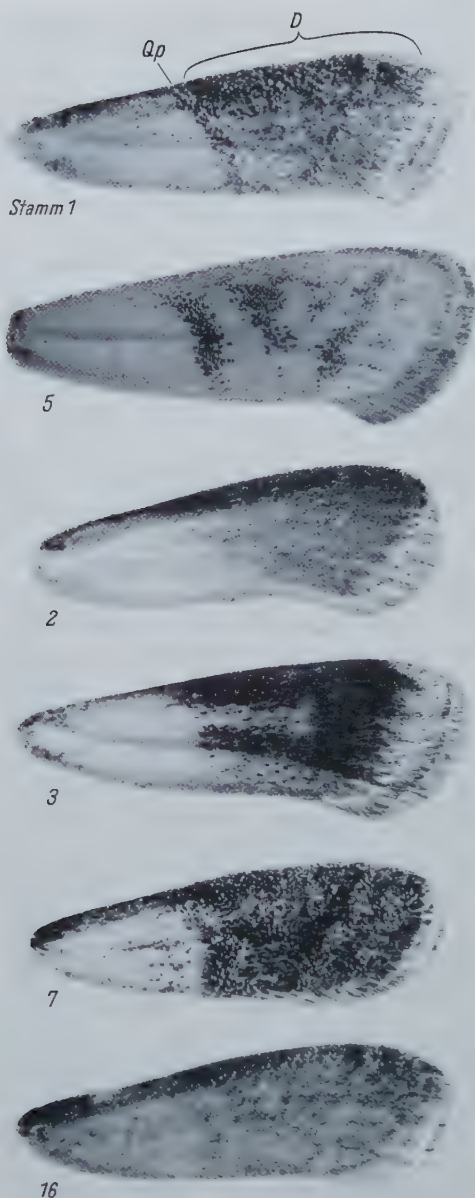


Abb. 1. *Plodia*-Flügel von den untersuchten Stämmen: 1, 5, 2, 3, 7 und 16. — Die Flügel von Stamm 5 (Mutante *g*) sind gelb, alle anderen rot gefärbt. Der zu Kreuzungen verwendete Stamm 4 hat gelbe Flügel mit gleichem Muster wie der rotflügelige Stamm 2. — *D* distaler Flügelteil, *Qp* proximale Querbinde, die Grenze zwischen proximalem und distalem Flügelteil

dimensional chromatographiert. Die Flügel (nur Vorderflügel) wurden vor der Extraktion kurz mit Äther entfettet. Sie wurden zweimal mit Methanol-NH₃ extrahiert; die Haupt-

hierzu sind die Stämme 3 und 7 durch sehr viele schwarze Schuppen gegenüber der Wildform ausgezeichnet (Abb. 1).

Für die Anregung zu dieser Arbeit und für die stete Anteilnahme danke ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. ALFRED KÜHN.

A. Methoden

Versuchsobjekte waren *Plodia*-Stämme des Institutes. Sie wurden bei 30° C und 90 % Luftfeuchtigkeit auf Weizenschrot mit einer bestimmten Melasse-Beimengung in der von SCHWARTZ (1953) angegebenen Weise gezüchtet.

Die Entwicklungsdauer beträgt 4 Wochen. Von diesen entfallen 4—5 Tage

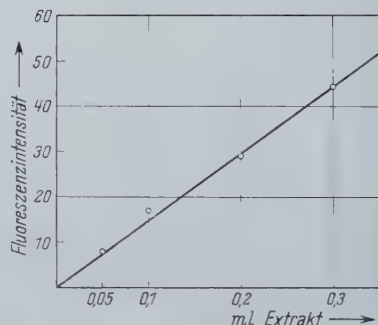


Abb. 2. Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (in Skalenteilen) von der Menge des für ein Chromatogramm verwendeten Extraktes (in ml)

auf die Embryonalzeit und 5—6 Tage auf die Puppenruhe. Am 3. Tag der Puppenruhe findet die Augenausfärbung statt, und am 5. Tag beginnt die Flügelausfärbung.

Zur chromatographischen Untersuchung wurden Tiere verschiedener Entwicklungsstadien verwandt. Die Objekte wurden in einer bestimmten Menge Methanol-NH₃ (75 Teile Methanol, 1 Teil konz. NH₃, 24 Teile dest. H₂O) zerrieben, kurz im Wasserbad zum Sieden gebracht (20 sec), um die Eiweißstoffe auszufällen, zentrifugiert und der Überstand auf Whatmann-I-Papier aufgetragen und im jeweils angegebenen Laufmittel ein- bzw. zwei-

menge fluoreszierender Substanzen befand sich erst im zweiten Extrakt. Bei quantitativen Untersuchungen wurden 3 mg Flügel pro Chromatogramm benötigt. Diese Menge entspricht ungefähr 50 Flügeln. Zur quantitativen Körperuntersuchung wurden von Raupen der frühen Entwicklungsstadien jeweils genau 20 mg abgewogen. Von Wanderräupen, Puppen und Imagines kamen pro Chromatogramm je 2 Individuen zur Verwendung, deren Fluoreszenzintensität dann auf 20 mg bezogen wurde. Dieses Verfahren ist, wie aus Vorversuchen mit steigender Substanzmenge hervorging, durchaus vertretbar: die Fluoreszenzintensität steigt im vorgegebenen Mengenbereich geradlinig mit der Quantität der Substanz an (Abb. 2).

Cöcalblasen wurden aus Puppen mit bereits ausgefärbten und aus solchen mit noch nicht ausgefärbten Flügeln herauspräpariert. Je Chromatogramm wurden 10 Stück verwendet.

Zur Untersuchung der Eier wurden die in den Zuchtshalen abgesetzten Gelege gesammelt. Je Chromatogramm wurden hiervon 20 mg verarbeitet.

Chromatogramme der Serienversuche wurden zweidimensional in den Lösungsmitteln Propanol (70%) für die erste Dimension und Natrium-Citrat (4%) für die zweite Dimension durchgeführt. Diese Laufmittel erwiesen sich bei Vergleich mit anderen als besonders günstig.

Zur quantitativen Auswertung der fluoreszierenden Stoffe wurden die im UV-Licht markierten Flecke ausgeschnitten und ihre Fluoreszenzintensität in dem von KÜHN (1955) beschriebenen Fluorometer gemessen. Infolge der guten Trennung der einzelnen Stoffe war es möglich, mit einer Schablone alle Flecke in gleicher Größe herauszuschneiden, so daß sich nach Subtraktion der Papierfluoreszenz direkt die Fluoreszenzintensität der Flecken ergab. — Absorptionsmessungen mit dem Zeiss-Spektralphotometer wurden nach der chromatographischen Trennung in Propanol-Na-Citrat und Elution in NaOH, H₂O oder HCl durchgeführt.

B. Ergebnisse

I. Die vorkommenden fluoreszierenden Stoffe

Nach chromatographischer Trennung in den Lösungsmitteln Propanol-Na-Citrat treten 20 Flecke regelmäßig auf. Andere nur gelegentlich oder schwach

Tabelle 1. Zusammenstellung der untersuchten fluoreszierenden Stoffe mit Angabe von Farbe, Fluoreszenz und R_f -Werten in verschiedenen Laufmitteln. Die bereits bekannten chemischen Bezeichnungen und die für entsprechende Flecke bei *Ephesia* verwendeten Symbole sind zum Vergleich mit angeführt

Bezeichnung	Bekannt von <i>Ephesia</i>	Chemische Bezeichnung	Farbe	Fluoreszenz	R_f -Werte			
					Propanol	Citrat	Prop.-NH ₃	Collidin
st				gelb	0,1	0,00		
ge	b_1 (?)			gelb	0,05	0,35	0,1	0,06
bl ₁	c_2 (?)			blau	0,08	0,25	0,1	0,1
blgr				blaugrün	0,12	0,8		
Isox	g	Isoxanthopterin	gelb	blauviolett	0,18	0,35	0,2	0,25
Xanth	h, f	Xanthopterin	gelb	hellblau	0,16	0,4	0,2	0,3
Ri	Ri	Riboflavin		gelb	0,27	0,28	0,44	0,56
gr			grün	grün	0,3	0,15	0,48	0,55
bl ₂				blau	0,32	0,4	0,35	0,4
Oxy-Ky		Hydroxy-Kynurenin	gelbgrün	grün	0,32	0,64	0,4	0,2
Ky		Kynurenin		blau	0,43	0,76	0,5	0,1
Trypt	z	Tryptophan		hellblau	0,4	0,63	0,55	0,4
blvi ₁				blauviolett	0,4	0,85		
blvi ₂				blauviolett	0,48	0,85		
Xs		Xanthurensäure		hellblau	0,51	0,27	0,53	0,62
r	r			blaugrün	0,45	0,42	0,6	0,35
s	s			blaugrün	0,55	0,42	0,75	0,6
bl ₃			orange	blauviolett	0,82	0,47		
bl ₄				blau	0,82	0,62		
rot			braun	rot	0,5	0,00	0,5	

erscheinende Flecke werden nicht berücksichtigt. Die Verteilung der einzelnen Substanzen auf die verschiedenen Körperabschnitte, auf Meconien und auf Eier ist aus Abb. 3 zu ersehen. Um die Flecken mit entsprechenden Stoffen von

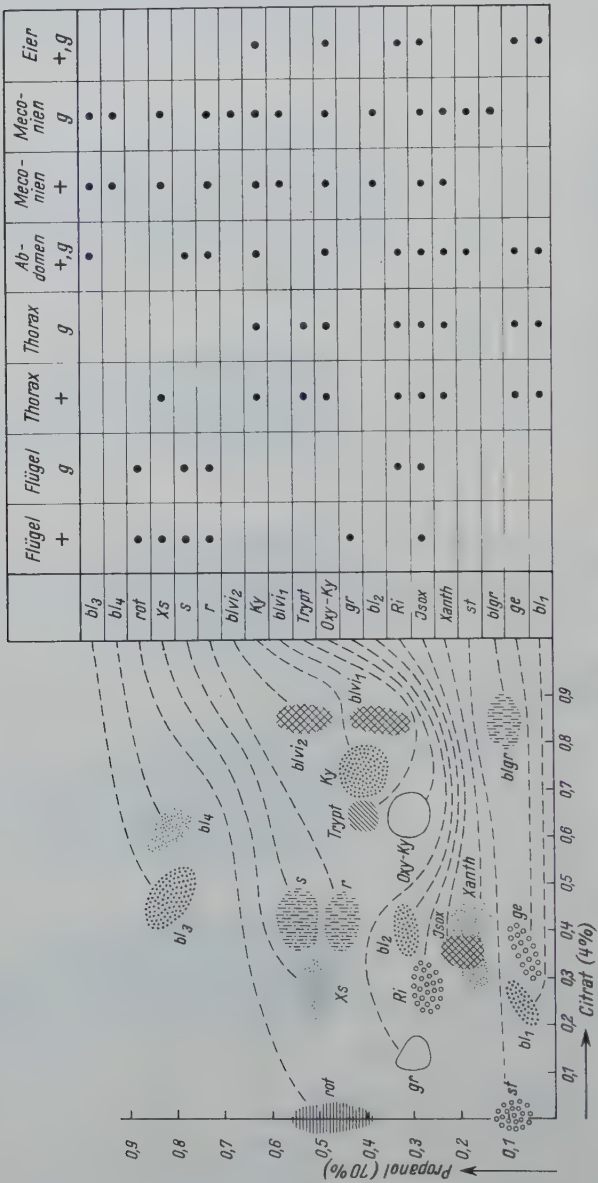


Abb. 3. Verteilung der fluoreszierenden Stoffe auf Flügel, Thorax, Abdomen, Meconien und Eier bei den Genotypen g^+ und a^- . — Signaturen der Fluoreszenzfarben: kleine Kreise: blau; groß punktiert: gelb; fein punktiert: hellblau; kariert: blaviolett; Schrägstriche: fahlblau; strichpunktiert: blaugrün; Querstriche: rot; nicht ausgefüllte Fleckumrandung: grün. — Von den im Schema dargestellten Stoffen sind: Xs Xanthurensäure; Ky Kynurenin; Trypt Tryptophan; Oxy-Ky Hydroxy-Kynurenin; Ri Riboflavin; Isox Isoxanthopterin; Xanth Xanthopterin

Ephestia (HADORN und KÜHN 1953, EGELHAAF 1956) vergleichen zu können, wurden die R_f -Werte zum Teil in den dort verwendeten Lösungsmitteln gemessen (Tabelle 1). Zur chemischen Untersuchung wurden qualitative Nachweisreaktionen ausgeführt und soweit möglich Absorptionsspektren aufgenommen.

Die vorläufige Bezeichnung der noch unbekannten Stoffe wurde nach ihrer Fluoreszenzfarbe gewählt. Bei erwiesener Identität mit den bei *Ephestia* vorkommenden Stoffen ist die dort verwendete alphabetische Bezeichnungsweise weitergeführt worden.

Die chemischen Nachweise sind vor allem auf Stoffe des Tryptophan-Stoffwechsels gerichtet und wurden in der von HELLMANN (1951) angegebenen Weise ausgeführt. Festgestellt wurden folgende bekannte Stoffe: *Kynurenin*, *Hydroxy-Kynurenin*, *Xanthurensäure* und *Tryptophan*.

Ausgeführte Nachweis-Reaktionen (Fleckbezeichnungen wie in Abb. 3).

1. Ninhydrin-Reaktion. Das Chromatogramm wurde wie gewöhnlich in Propanol und Na-Citrat entwickelt und mit 0,1%iger Ninhydrin-Lösung besprüht, danach kurz bei 80° getrocknet.

Positive Reaktion zeigen die Flecke:

Oxy-Ky	— gelbbraun
Ky	— blauviolett
Trypt	— blauviolett
blvi ₁	— blauviolett

2. Ehrlichsche Reaktion. Nach Besprühen des Chromatogrammes mit einer Lösung von 2 g p-Dimethyl-aminobenzaldehyd in 100 cm³ 20%iger HCl und anschließendem Trocknen bei 60° zeigen sich Farbreaktionen bei:

Oxy-Ky	— orange
Ky	— gelborange
Trypt	— blauviolett

3. Folinische Reaktion. Auf Phosphormolybdänwolframsäure reagieren mit blauer Farbe:

Oxy-Ky	
Xs	
blvi ₁	

4. AgNO₃-Reaktion. Außer Oxy-Ky und Xs reagiert Harnsäure, die gleiche R_f-Werte wie Isoxanthopterin hat und durch starke Absorption im kürzeren Wellenlängenbereich auf dem Chromatogramm erkannt wird.

5. Bildung von Azo-Farbstoffen

a) PAULYS Diazo-Reaktion (KIKKAWA 1941, UMEBACHI und TSUCHITANI 1955): Hierfür wurde eine Mischung von 1,75% HCl mit 0,5% Sulfanilsäure und 0,5% NaNO₂ im Verhältnis 40:1 hergestellt und das Chromatogramm besprüht, getrocknet und anschließend mit 35% NH₄OH oder gesättigter Na₂CO₃-Lösung behandelt. Die Reaktion ist positiv für:

Oxy-Ky	— rot
blvi ₁	— rot

b) Kupplung mit Äthyl- α -Naphthylamin. Das Chromatogramm wurde mit NaNO₂ (0,2%) in 0,1% HCl besprüht, getrocknet und dann mit 0,2% Äthyl- α -Naphthylamin behandelt. Es reagieren:

Xs	— gelb
Ky	— rot

Zur Bestätigung wurden synthetische Vergleichssubstanzen¹ verwendet. Es bestand eindeutige Identität sowohl im R_f-Wert als auch in den beschriebenen Reaktionen der vier analysierten Stoffe mit den entsprechenden synthetischen. — Die Natur des Flecks blvi₁ ist dagegen noch unbekannt.

Die Pteridine Xanthopterin und Isoxanthopterin sind von *Drosophila* und *Ephestia* bekannt (VISCONTINI, SCHÖLLER, LÖSER, KARRER und HADORN 1955, VISCONTINI, KÜHN und EGELHAAF 1956). Zur weiteren Bestätigung der gefun-

¹ Für die Überlassung von Kynurenin, Hydroxy-Kynurenin und Hydroxy-Anthranilsäure danke ich Herrn Professor Dr. BUTENANDT, München. Xanthurensäure und Tryptophan wurde von der Firma Schuchardt, München, bezogen.

denen Ergebnisse wurden Absorptionsspektren aufgenommen und mit solchen synthetischer Stoffe verglichen. Dabei ergibt sich vollkommene Identität der Kurven für Kynurenin, Hydroxy-Kynurenin und Xanthurensäure (Abb. 4).

Auch von einer Anzahl unbekannter Fluoreszenzstoffe wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Sie konnten jedoch nicht mit solchen bekannter Stoffe gleichgesetzt werden.

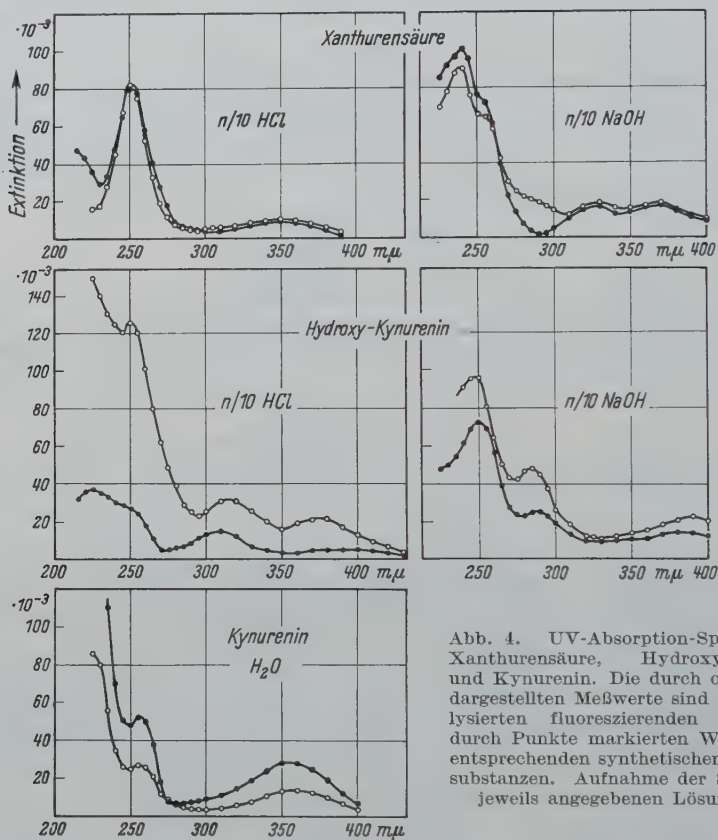


Abb. 4. UV-Absorptionsspektren von Xanthurensäure, Hydroxy-Kynurenin und Kynurenin. Die durch offene Kreise dargestellten Meßwerte sind die der analysierten fluoreszierenden Stoffe, die durch Punkte markierten Werte die der entsprechenden synthetischen Vergleichssubstanzen. Aufnahme der Spektren im jeweils angegebenen Lösungsmittel

Der Fleck bl_3 entspricht in R_f -Wert, Fluoreszenz und Farbe synthetischer Anthranilsäure. Im Absorptionsspektrum (Abb. 5) liegt jedoch keine Übereinstimmung vor.

λ max (NaOH) bl_3	230, 285, 330 $m\mu$
Hydroxy-Anthranilsäure	330 $m\mu$
Anthranilsäure	240, 315 $m\mu^2$.

Zu diesem Vergleich wurde Hydroxy-Anthranilsäure und Anthranilsäure (Merck, Darmstadt) im gleichen Lösungsmittel-System chromatographiert und in gleicher Weise wie bl_3 extrahiert und gemessen.

Auch die chemischen Reaktionen mit $AgNO_3$ auf Hydroxy-Anthranilsäure und mit Äthyl- α -Naphthylamin auf Anthranilsäure sprechen bei bl_3 nicht an. Auffallend ist jedoch die fast vollständige Übereinstimmung der Absorptionsmaxima von Erythropterin mit bl_3 .

² Vgl. WISS und HELLMANN (1953).

Die Maxima liegen für Erythropterin bei 235, 285, 335 $m\mu$. In hoher Konzentration erscheint bl_3 orange und hat blauviolette Fluoreszenz. Ob bl_3 dem Erythropterin gleichzusetzen ist, wurde nicht näher untersucht. DANNEEL und ZIMMERMANN (1954) beschreiben bei *Drosophila* bei R_f 0.8 in Propanol- NH_3 auch einen blauvioletten Fleck, der wie bl_3 nicht mit Äthyl- α -Naphthylamin reagiert. Vielleicht handelt es sich um die gleiche Substanz.

Der Fleck bl_2 entspricht in R_f -Wert und Fluoreszenzfarbe den k-Flecken bei *Ephestia* (VISCONTINI, KÜHN und EGELHAAF 1956) bzw. Hb_1 und Hb_2 bei *Drosophila* (VISCONTINI, SCHÖLLER, LÖSER, KARRER und HADORN 1955). Ob er mit diesen identisch ist, kann hieraus aber noch nicht eindeutig geschlossen werden.

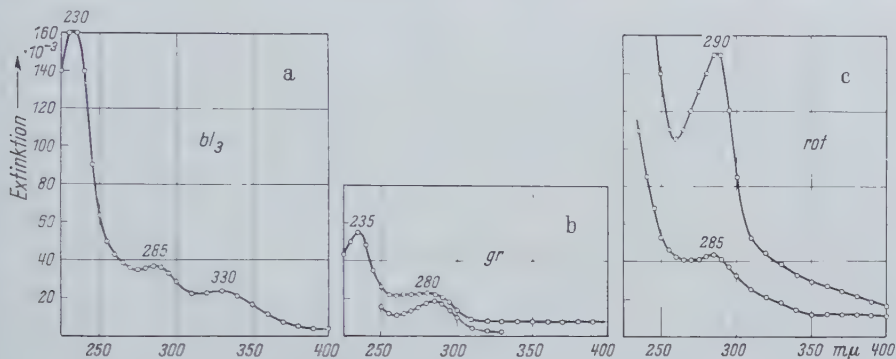


Abb. 5 a—c. UV-Absorptions-Spektren: a Fleck bl_3 ; b Fleck gr , in zwei verschiedenen Konzentrationen; c Fleck rot , in zwei verschiedenen Konzentrationen. — Aufnahme der Spektren in $n/10$ HCl

Der Fleck $blgr$, der nach seiner eisgrünen Fluoreszenz einem der c-Flecken von *Ephestia*-Köpfen zu entsprechen schien, unterscheidet sich aber nach exaktem Vergleich von letzterem in den R_f -Werten. In Propanol haben beide Flecke den gleichen R_f -Wert von 0.1, in Na-Citrat aber hat Fleck c einen R_f von 0,6 und Fleck $blgr$ einen von 0,8.

Der Fleck $blgr$ besteht aus zwei Anteilen: einem blauen, nur in kurzwelligem UV-Licht sichtbaren, mit R_f 0.7 (Na-Citrat) und einem eisgrünen mit R_f 0,9 (Na-Citrat). Der oben angegebene R_f -Wert von 0.8 stellt das Mittel dieser beiden Werte dar. — In *Ephestia*-Flügeln kommt der gleiche Fleck $blgr$ mit gleichen R_f -Werten vor.

Die Flecken r und s, die auch von HADORN und EGELHAAF (1955) bei *Ephestia* gefunden wurden, zeigen beide blaugrüne Fluoreszenzfarbe. In Na-Citrat haben sie gleichen R_f -Wert von 0,42, in Propanol dagegen differieren sie: r — 0,45; s — 0,55. Für beide Flecken liegen die Absorptionsmaxima bei 225 und 285 $m\mu$. Aus früheren Untersuchungen an *Ephestia*-Flügeln ergaben sich andere Maxima bei gleichen Versuchsbedingungen:

r —	225,	245,	270,	290 $m\mu$
s —			265,	290, 350 $m\mu$
r —	220,	265,		350 $m\mu$ (nach EGELHAAF 1956).

Worauf diese Differenzen beruhen, ist noch unbekannt. Fleck r entspricht im R_f -Wert der Kynurensäure, zeigt aber weder das für diese charakteristische Verhalten im UV-Licht — Zunahme der Fluoreszenzstärke mit Dauer der Belichtung — noch die für Kynurensäure spezifischen Absorptionsmaxima bei 245 und

335 $m\mu$. Es könnte allerdings sein, daß Kynurensäure von r und s überlagert ist, und daß deshalb die für sie spezifische Fluoreszenzerscheinung nicht auffällig wird.

Nach EGELHAAF (1956) scheint es sich bei r und s um Stoffwechselendprodukte zu handeln, die mit dem Kynurenin-Stoffwechsel zusammenhängen, da sie bei *a-Ephestia* fehlen.

Der Fleck gr, der nur bei rotflügeligen Imagines auftritt, ist in seiner chemischen Natur ebenfalls noch unbekannt. Seine Absorptionsmaxima (Abb. 5b), die bei 235 und 280 $m\mu$ liegen, konnten mit keiner mir bekannten chemischen Verbindung identifiziert werden. Sie stimmen allerdings mit den grün-fluoreszierenden Flecken aus *Ephestia*-Flügeln überein, deren Absorptionsmaxima bei 210, 235 und 290 $m\mu$ liegen. Bei *Ephestia* ist der grüne Fleck in der ebenfalls von mir untersuchten *he*-Mutante verstärkt gegenüber der Wildform.

Der rot-fluoreszierende Fleck, der auch bei *Ephestia*, ferner bei von mir zum Vergleich herangezogenen Nymphaliden gefunden wurde, ist hauptsächlich charakterisiert durch seine Absorptionskurve, die nur ein Maximum bei 287 $m\mu$ hat (Abb. 5c). Die Untersuchung des chemischen Verhaltens ergab, daß der rot-fluoreszierende Stoff in Salzsäure und Alkohol gut, in Wasser und in Methanol-NH₃ schwerlöslich ist. Nach Chromatographie wird er durch Bedampfen mit NH₃ intensiver rot, durch Behandlung mit Säuren dagegen gelblicher.

Ob es sich bei dem rot-fluoreszierenden Stoff um ein Pteridin handelt, ist noch nicht geklärt. Chromatographie in dem von VISCONTINI, HADORN und KARRER (1957) für Drosoplerin angegebenen Lösungsmittel ergibt zwar einen niederen R_f -Wert, der dem des Drosoplerins entsprechen könnte, jedoch ist der R_f -Wert in Butanol-Essigsäure vollkommen anders: für Drosoplerin 0,1, für den rot-fluoreszierenden Stoff 0,9.

Das von SCHÖPF und BECKER (1936) in roten Schmetterlingsflügeln gefundene Erythropterin zeigt eine blauviolette Fluoreszenz. Es ist also auch nicht mit dem rot-fluoreszierenden Fleck vergleichbar.

Die Flecke ge und bl₁ sind wahrscheinlich mit den Flecken b₁ und c₂ von *Ephestia* identisch.

Der Fleck st ist nur durch Fluoreszenzfarbe und R_f -Wert charakterisiert. Eine zusammenfassende Darstellung dieser Charakteristika ist aus der Tabelle 1 zu ersehen.

Photolabilität. Nach Belichtung des Extraktes mit UV-Licht verschwindet der Fleck Ri. Es tritt dafür ein anderer mit dem R_f -Wert 0,65 in Propanol und 0,4 in Na-Citrat auf, der wahrscheinlich ein Abbauprodukt von Ri darstellt. Aus gleichem Verhalten von synthetischen Riboflavin und gleichen R_f -Werten in verschiedenen Lösungsmitteln, scheint Ri mit Riboflavin identisch zu sein. — Photolabil ist ferner der Fleck ge, der bei längerer UV-Belichtung ganz verschwindet. — Die von EGELHAAF (1956) und von VISCONTINI, LÖSER und EGELHAAF (1956) beschriebenen photolabilen k-Stoffe wurden nicht gefunden. Der Fleck bl₂, der vielleicht mit einem der k-Stoffe identisch ist, zeigte keine Lichtempfindlichkeit.

II. Flügeluntersuchungen

1. Frage nach der Natur der Flügelfarbstoffe. Das rote bzw. gelbe Flügelpigment erscheint nicht als roter oder gelber Fleck in den Chromatogrammen.

Der im UV-Licht nachweisbare rot-fluoreszierende Fleck (Abb. 3, rot) ist mit dem Flügelpigment nicht identisch.

Ein salzsaurer Extrakt roter Flügel ist gelb, färbt sich aber im Alkalischen wieder rot. Die gleiche Eigenschaft ist am Flügel auch direkt zu beobachten. Der Vorgang ist beliebig reversibel, sowohl am Flügel, als auch im Extrakt.

Ein saurer Extrakt gelber Flügel ist auch gelb, färbt sich im Alkalischen aber nur schwach rötlich, zeigt damit jedoch auch eine Farbänderung. Am Flügel selbst wird im Alkalischen der Umschlag nach rot nicht hervorgerufen. Der reversible Farbumschlag tritt also bei gelben Flügeln nur im Extrakt auf. Anscheinend liegt der gelbe Farbstoff in gebundener Form vor und wird nach Extraktion erst frei und reaktionsfähig.

Nach alkalischer Hydrolyse sowohl roter als auch gelber Flügel ist der Extrakt gelb, während das saure Hydrolysat stark rot gefärbt ist. Nach Chromatographie ist aber kein roter Fleck zu erkennen. Um eine Beeinflussung des roten Farbstoffes durch die Laufmittel zu untersuchen, wurden die verschiedensten Lösungsmittel verwendet mit unterschiedlichem p_H . Alle zeigten den gleichen negativen Erfolg: ein roter Fleck war nicht nachzuweisen.

Um einer Identifizierung näher zu kommen, wurden die Flügelpigmente mit Farbstoffen verglichen, die an anderer Stelle im Tierreich vorkommen.

Ommochrome. Nach BUTENANDT u. Mitarb. wurden Methanol-HCl-Auszüge aus Flügeln bereitet und zur Untersuchung auf Ommine in einem Gemisch von $HCOOH$ -Methanol-HCl = 15:1:3 und zur Identifizierung von Ommatinen in einer Lösung von Collidin-Lutidin-Wasser = 1:1:2 oder Collidin-Phosphatpuffer = 2:3 chromatographiert. Es traten hierbei jedoch keine roten oder gelben Flecke im Chromatogramm auf. — Weitere Versuche nach NEEDHAM (1957), Chromatographie eines Methanol-HCl-Extraktes in NaH_2PO_4 + Harnstoff oder vorhergehende saure oder alkalische Hydrolyse des Extraktes bei 100°, waren ebenfalls ergebnislos.

Carotine. Infolge ihrer Löslichkeit in Pyridin, Chloroform und Aceton scheiden sie von der Untersuchung gleich aus, denn der rote Flügelfarbstoff ist in diesen Lösungsmitteln unlöslich.

Chinone. Sie sind wie der rote Flügelfarbstoff in saurem Alkohol löslich, aus diesem jedoch, im Gegensatz zum Flügelfarbstoff, mit Äther ausschüttelbar.

Aphidine (DUEWELL, HUMAN, JOHNSON, McDONALD und TODD 1948). Sie stimmen in ihrer Löslichkeit in Wasser und Alkohol mit dem Flügelfarbstoff überein, nicht aber mit der besonders guten Löslichkeit in Pyridin. Eine für die Aphidine charakteristische Farbreaktion war ebenfalls negativ. Diese Reaktion besteht in einer Farbänderung von rot über grün zu blau bei Zugabe von Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure zu einem wäßrigen Extrakt.

Trichosiderin (BARNICOT 1956). Es war sehr unwahrscheinlich, daß dieser bisher nur in menschlichen roten Haaren gefundene Farbstoff vorkommen würde. Nur der Vollständigkeit halber wurden seine aus der Literatur bekannten Absorptionskurven mit denen des Flügelextraktes verglichen. Es ergab sich, wie erwartet, keine Ähnlichkeit.

Anthocyane (THOMMSEN 1926, PAECH und TRACEY 1955). Da die Löslichkeit in Wasser, Salzsäure und Natronlauge mit dem Flügelfarbstoff übereinstimmt, wurden Reaktionen ausgeführt, von denen einige positiv, andere aber auch wieder negativ waren: Zum Beispiel wird die Bleiacetat-Reaktion sowohl im alkalischen als auch im neutralen Milieu gegeben. Es entsteht ein stark gelber bzw. schwach weißer Niederschlag.

Auch die Eisenchlorid-Reaktion erfolgt nach einiger Zeit mit einem dunkelgelben Niederschlag. Ferner färbt sich der gelbe, salzsaure Flügelextrakt wie Anthocyan bei Zugabe von Natriumcarbonat rotviolett. Dagegen tritt die Blaufärbung mit Natriumacetat nicht auf. Flügel-Chromatogramme färben sich mit Eisenchlorid oder Aluminiumchlorid nicht an.

Da einige Reaktionen für das Vorliegen von Anthocyanen sprechen, wurden zur weiteren Klärung dieser Frage Fütterungsversuche mit anthocyan-haltigem Futter durchgeführt.

Hierfür wurde das Weizenschrot mit dem Saft von Holunderbeeren durchtränkt. Die Raupen nahmen diese Nahrung an und entwickelten sich ebenso schnell wie die Kontrolltiere. Die zu diesen Versuchen verwendeten Stämme 8 und 16 (hellrot) und 5 (gelb) zeigten in ihrer Flügelfärbung keine Beeinflussung.

Die durchgeführten Untersuchungen geben also *keinen Hinweis auf die Natur des roten bzw. gelben Flügelpigmentes*. Es werden jedoch mehrmals in der Literatur Farbstoffe beschrieben, die das für das rote Flügelpigment charakteristische Verhalten bei verschiedenem p_H zeigen. BECKER (1937) beschreibt z. B. einen roten Schmetterlingsfarbstoff in Arctiden, Zygaeniden und den roten Flecken von *Papilio* und *Parnassius*, der wie der *Plodia*-Farbstoff in saurer Lösung von rot nach gelb umschlägt, in alkalischem Medium dann seine rote Farbe zurückerhält.

2. Andere für die Flügel charakteristische Stoffe. Die *schwarzen Farbstoffe*, die bei *Plodia*, wie bei vielen anderen Schmetterlingen, die dunkle Flügelzeichnung ausmachen, werden als *Melanine* bezeichnet. Sie sind allerdings in keinem der für Melanine beschriebenen Lösungsmittel löslich (LEA 1952, SCHMIDLI 1955).

Um festzustellen, ob ein Unterschied im Gehalt *freier Aminosäuren* zwischen gelben und roten Flügeln besteht, wurden zweidimensionale Chromatogramme in den Laufmitteln Propanol (70%) und Phenol (wassergesättigt) aufsteigend chromatographiert. Mit 0,1%iger Ninhydrin-Lösung wurden die einzelnen Aminosäuren sichtbar gemacht. Die gefundenen Stoffe sind: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Serin, Glycin, Lysin, Arginin, Threonin, α -Alanin, Glutamin, β -Alanin, Tyrosin, Valin, Leucin, Prolin, γ -Aminobuttersäure und ein Peptid, das als P_3 bezeichnet wurde. Die Stoffe wurden durch Vergleich mit entsprechenden Chromatogrammen von CHEN und KÜHN (1956) identifiziert. Ein qualitativer oder quantitativer Unterschied zwischen gelben und roten Flügeln konnte nicht ermittelt werden.

Von *Purinen* ist *Harnsäure* im Flügel vertreten. Sie hat in den Lösungsmitteln Propanol und Na-Citrat die gleichen R_f -Werte wie Isoxanthopterin. An der starken Absorption im kurzwelligen UV-Licht wird sie sofort erkannt. Von chemischen Reaktionen fallen die mit $AgNO_3$ positiv aus, ferner die Folinsche Reaktion mit Phosphormolybdänwolframsäure. Auffallend ist, daß *Harnsäure* bei *stark melaninhaltigen Stämmen vermehrt* auftritt, z. B. bei Stamm 7 (Abb. 1), während sie bei dem vollkommen melaninfreien Stamm 4 in geringer Konzentration vorliegt.

Die in Flügel-Extrakten auftretenden *fluoreszierenden Stoffe* zeigt Abb. 6. Von den überhaupt bei *Plodia* gefundenen Stoffen (Abb. 3) kommen nur sehr wenige vor. Zum Vergleich zwischen der Wildform und der gelb-flügeligen Mutante *g* wurden von allen Instituts-Stämmen, die sich im Flügel durch Färbung und Zeichnung unterscheiden, eindimensionale Chromatogramme gemacht (Abb. 7). Hierbei treten drei Fluoreszenzmaxima als besonders charakteristisch hervor. Aus zweidimensionalen Chromatogrammen (Abb. 6) ist zu ersehen, welche Flecken diesen Maxima zugrunde liegen: das erste Maximum entsteht hauptsächlich durch Isoxanthopterin, das zweite wird von gr gebildet und das dritte durch rot, r und s hervorgerufen. — Beim Vergleich der rot-flügeligen Stämme (Abb. 7): 7, 16, 1 und 3 mit den gelb-flügeligen Stämmen: 5, 13, 11 und 6 fällt sofort auf, daß das zweite Fluoreszenzmaximum bei letzteren fehlt. Das erste und dritte Maximum

entspricht dagegen dem der rot-flügeligen Tiere. Der Fleck *gr* ist für den roten Flügel charakteristisch und kommt in Körper-Extrakten von *Plodia* nicht vor.

Aus zweidimensionalen Chromatogrammen ergibt sich außerdem ein Unterschied im dritten Fluoreszenzmaximum: während rot-flügelige Tiere in diesem

Bereich besonders viel Xanthurensäure und nur wenig *r* und *s* enthalten, liegt bei gelb-flügeligen Tieren das Verhältnis umgekehrt: sie enthalten viel *r* und *s* und keine Xanthurensäure. Auffallend ist, daß bei Vorhandensein von Kynurensäure *r* und *s* vollkommen fehlen kann, so bei den von mir untersuchten Nymphaliden, SpHINGiden und Geometriden. — Der rot-fluoreszierende Fleck ist bei rot- und gelbflügeligen *Plodien* gleich stark. — Innerhalb der roten bzw. gelben Flügelmutanten ist keine Beziehung der Fleckenstärke zum Grad des schwarzen

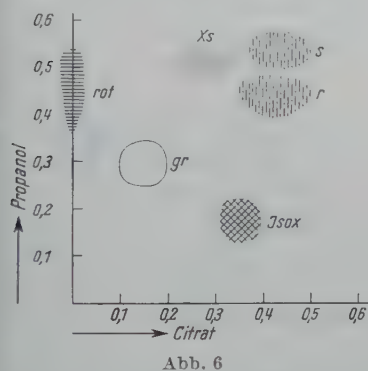


Abb. 6

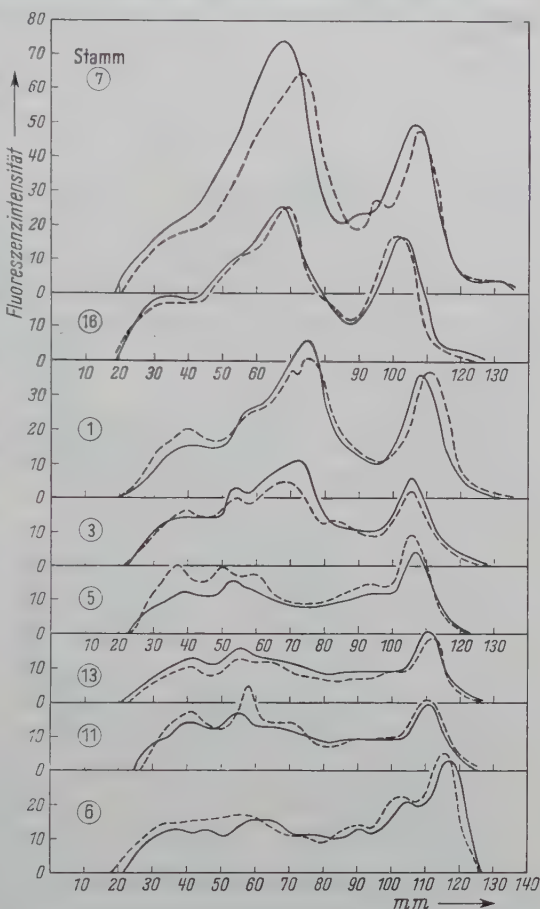


Abb. 7

Abb. 6. Schema eines zweidimensionalen Flügel-Chromatogrammes von *Plodia*. Signaturen und Bezeichnungen der fluoreszierenden Flecke vgl. Abb. 3

Abb. 7. Fluorometer-Kurven eindimensionaler Chromatogramme von Flügeln verschiedener *Plodia*-Stämme. Für jeden Stamm sind 2 Kurven angegeben, um die Streubreite zu zeigen. Die Stämme 7, 16, 1 und 3 sind rotflügelig. Die Stämme 5, 13, 11 und 6 sind gelbflügelig

Musters festzustellen. Zum Beispiel ist die Fluoreszenzstärke der Flecken *gr* und Xanthurensäure bei Stamm 7 (Abb. 1), der starke dunkle Querbinden hat, ebenso hoch wie bei Stamm 16, dem die Pigmentierung der Bindenschuppen fast ganz fehlt.

3. Lokalisation der Stoffe im Flügel. Um eine Zugehörigkeit der fluoreszierenden Flecke zur Färbung festzustellen, wurden proximale und distale Flügelabschnitte getrennt chromatographiert. Bei *g*⁺ zeigte sich (Abb. 8), daß die Xanthurensäure nahezu gleichmäßig über den ganzen Flügel verteilt ist, während

sich *Fleck gr* im gefärbten distalen Abschnitt anreichert. Die bei gelben Flügeln besonders starken Flecken *r* und *s* kommen ebenfalls im distalen Teil vermehrt vor. Es scheint also, daß die Flecke *gr*, *r* und *s* in einem Zusammenhang mit der roten bzw. der gelben Flügelfarbe stehen.

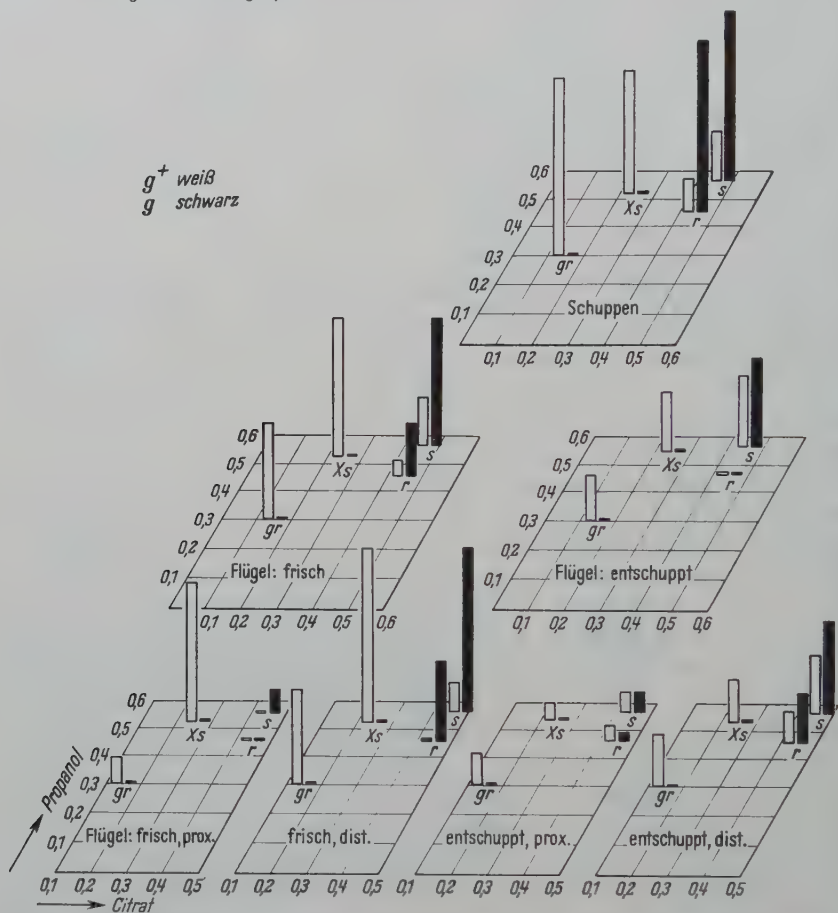


Abb. 8. Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Flecken in zweidimensionalen Chromatogrammen (Mittelwerte aus 4—7 Einzelmessungen) von Schuppen, frischen und entschluppten Flügeln und von proximalen und distalen Flügelabschnitten. — Weiße Säulen: rotflügeliger Stamm 1, schwarze Säulen: gelbflügeliger Stamm 5

Um zu entscheiden, ob die fluoreszierenden Stoffe nur in Schuppen, nur in der Flügelhaut oder in beiden gleichermaßen vorhanden sind, wurden *entschluppte Flügel* untersucht und zwar zunächst ganze Flügel, danach auch proximale und distale Flügelabschnitte getrennt. Beim Vergleich der ungeteilten entschluppten Flügel mit solchen von frischgeschlüpften Tieren ist sofort ersichtlich, daß alle fluoreszierenden Flecke in geringerer Konzentration vorliegen. Während Fleck *r* fast vollständig fehlt, ist Fleck *s* noch in verhältnismäßig hoher Konzentration vorhanden. Xanthurensäure und *gr* sind etwa auf die Hälfte gesunken. Bei der getrennten Chromatographie proximaler und distaler entschluppter Abschnitte zeigte sich dann, daß alle fluoreszierenden Stoffe hauptsächlich im distalem

Flügelbezirk angereichert sind. Da bei der Durchführung dieser Versuche eine vollständige Entfernung der Schuppen nicht zu erreichen war, kann dies Resultat wenigstens zum Teil auf noch vorhandenen Schuppen beruhen.

Chromatogramme von *Schuppen allein* ohne Flügelhaut zeigen die höchste Konzentration an fluoreszierenden Stoffen. Beim Vergleich eines Schuppen-Chromatogrammes mit einem solchen entschluppter Flügel, vor allem mit dem des proximalen entschluppten Flügelabschnittes, ist es eindeutig, daß die fluoreszierenden Stoffe hauptsächlich in den Schuppen abgelagert werden. *Die Schuppen sind also sowohl Träger der roten bzw. gelben und schwarzen Flügelpigmente, als auch Träger der fluoreszierenden Stoffe.*

Auffallend ist, daß *Xanthurensäure*, die nur bei rotflügeligen Tieren vorkommt, nicht bevorzugt in roten Schuppen zu finden ist, sondern in gleicher Konzentration auch in den gelblich-weißen Schuppen des proximalen Flügelbezirkes.

4. Kreuzungen. Die Verknüpfung des Fehlens des Stoffes *gr* und der *Xanthurensäure* mit der Gelbflügeligkeit (Abb. 8) tritt auch in den Kreuzungen eines rotflügeligen mit einem gelb-flügeligen Stamm eindeutig hervor. Da *g* im Farbton rezessiv ist, sind alle F_1 -Tiere rot-flügelig. Doch macht sich die Heterozygotie in einer starken Senkung des Wertes von *gr*, noch mehr von *Xanthurensäure* geltend (Tabelle 2). Den in F_2 herausspaltenden Gelbflügeligen fehlen wieder beide Stoffe. Das mutierte Gen *g* unterdrückt also *polyphän* auch die Bildung von *gr* und *Xanthurensäure* oder — weniger wahrscheinlich — mit *g* sind Faktoren, welche dies leisten, eng gekoppelt. Der niedere Wert der beiden Stoffe bei den in F_2 herausspaltenden Rotflügeligen kommt mindestens zum Teil durch den Anteil an Heterozygoten zustande, der sich bei der geringen Anzahl von Messungen nicht abschätzen läßt. Immerhin ist die Senkung so stark, daß wahrscheinlich mit dem Stamm 4

Tabelle 2. Kreuzung eines rotflügeligen Stammes (16) mit einem gelbflügeligen Stamm (4).

Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der Flecken von je 4—6 zweidimensionalen Chromatogrammen von Extrakten aus jeweils 50 frischen Flügeln

	<i>gr</i>		<i>Xanthurensäure</i>	
	rotflügelig	gelbflügelig	rotflügelig	gelbflügelig
P	140	0	370	0
F_1	40	—	46	—
F_2	54	0	88	0

auch noch weitere *gr* und *Xanthurensäure* herabsetzende Faktoren eingekreuzt worden sind, die sich in dem Stamm 4 nicht geltend machen, da *g* allein schon die volle unterdrückende Wirkung ausübt.

5. Parabiosen. Parabiose-Versuche, die bereits von SCHWARTZ (1953) ausgeführt und beschrieben wurden, waren insofern negativ, als gelbe Flügel in ihrer Farbe nicht von rotflügeligen Individuen beeinflusst werden. Sowohl gelbe als auch rote Flügel werden ihrer Anlage gemäß ausgefärbt und zeigen auch im Fluoreszenzmuster keine Veränderungen.

III. Körperuntersuchungen

1. Stoffbestand der Wildform und Vergleich mit der Mutante *g*. Die Stoffverteilung eindimensionaler Chromatogramme der Wildform (Abb. 9) läßt vier Maxima erkennen, die vom ersten bis zum vierten stetig niedriger werden. Das vierte Maximum kann auch ganz fehlen. Im Gegensatz hierzu treten bei Flügeln (Abb. 7) immer nur drei Maxima auf. Auch ist bei Flügeln das zweite Maximum

das höchste und das erste am niedrigsten. Die R_f -Werte (in mm angegeben) der einzelnen Maxima sind bei Flügelchromatogrammen ebenfalls andere als bei Körperchromatogrammen, wie aus den entsprechenden Abbildungen leicht zu ersehen ist. Es muß also im Körper ein anderer Stoffbestand vorliegen.

Zweidimensionale Chromatogramme (Abb. 10) zeigen, um welche fluoreszierenden Flecke es sich handelt. Auffallend ist zunächst die größere Anzahl an Stoffen im Vergleich zu den Flügeln. Außer den auch im Flügel vorkommen-

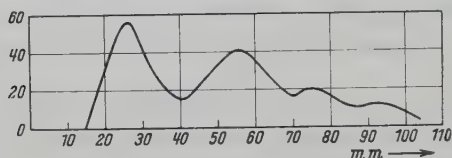


Abb. 9. Fluorometer-Kurve eines eindimensionalen Chromatogrammes von *Plodia*-Körpern

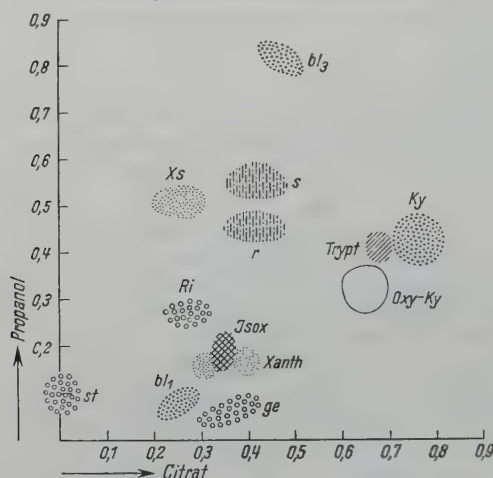


Abb. 10. Schema eines zweidimensionalen Körper-Chromatogrammes von *Plodia*. — Signaturen der Fluoreszenz-Farben und Fleckenbezeichnungen vgl. Abb. 3

den Flecken Isoxanthopterin, Xanthurensäure, r und s, treten die Stoffe st, bl₁, ge und Xanthopterin auf, die mit Isoxanthopterin das erste und höchste Fluoreszenzmaximum im eindimensionalen Chromatogramm bilden; ferner Riboflavin, Tryptophan, Hydroxy-Kynurenin und Kynurenin, die zusammen das zweite Maximum hervorrufen, während der Stoff gr, der bei Flügeln für das zweite und hier stärkste Maximum verantwortlich ist, fehlt.

Xanthurensäure, r und s bewirken, ohne den nur in Flügeln vorhandenen Fleck rot, das dritte Maximum. Der Fleck bl₃ als viertes Maximum ist in der Stärke seines Vorkommens nicht konstant.

Die gelbflügelige Mutante *g* zeigt auch im Körper stoffliche Unterschiede zu der Wildform *g*⁺: wie dem Flügel fehlt auch dem Körper die Xanthurensäure. Der Stoff st, der allgemein im Flügel fehlt, ist im *g*-Körper in höherer Konzentration vorhanden. Das übrige Fluoreszenzmuster entspricht dem der Wildform.

Die verschiedene Flügelmusterung der Stämme 2, 3, 7 und 16 hat keinen eindeutigen Einfluß auf den Stoffbestand und die Stoffmenge im Körper. Besonders starke individuelle Unterschiede zeigt der Fleck r und zwar unabhängig von der Flügelfarbe.

2. Parabiosen. Da Parabiosen auf Flügelfarbe und Bestand der fluoreszierenden Flügelstoffe keinen Einfluß haben, war es von Interesse festzustellen, wie sich in dieser Hinsicht die Körperfluoreszenz verhält.

Parabiose-Partner waren der rotflügelige, schwarzäugige Stamm 1 und der gelbflügelige, rotäugige Stamm 13. Sie wurden kurz nach der Verpuppung am hinteren Körpersegment in Parabiose vereinigt und ungefähr 6 Tage später, nach vollkommener Ausbildung zur Imago, einzeln chromatographiert.

Die Chromatogramme zeigten bei beiden Parabiose-Partnern erstaunliche Unterschiede im Vergleich zu nicht vereinten Kontrolltieren. Der Fleck *st* fehlte ganz, die Menge der Flecke *r* und *s* waren stark verringert. Dafür traten aber in besonders hoher Konzentration die Flecken *blgr*, *bl₂*, Hydroxy-Kynurenin, Kynurenin, *blvi₁* und *bl₃* auf. In den Flecken *bl₁*, *ge*, Isoxanthopterin und Riboflavin war praktisch kein Unterschied zu Normaltieren feststellbar. Xanthurensäure trat nur bei den roten Parabiose-Partnern auf, nicht bei den gelben.

Da es sich bei diesen Parabiosen um Vereinigung am Körperende handelte, wurde zunächst angenommen, daß die Änderung des Fluoreszenz-Musters durch die Beschädigung des Enddarmes verursacht wird. Kopfparabiosen zeigten dann aber überraschender Weise das gleiche Verhalten.

Es wurden daher Austauschvorgänge zwischen den Partnern der beiden verschiedenen Stämme vermutet, aber auch solche konnten nicht allein die Änderungen bedingen: auch solche Tiere, bei denen am letzten Körpersegment bzw. am Kopf eine Wunde gesetzt wurde, die dann aber nicht zur Parabiose verwandt, sondern mit paraffinverklebter Wunde als Kontrolle dienten, zeigten die Fluoreszenzmuster-Änderungen.

Die Erklärung ergab sich aber dann aus folgendem: alle am Kopf bzw. hinteren Körperabschnitt verwundeten Einzeltiere oder Parabionten färbten sich wie normale Tiere aus, konnten aber wegen der Wunde die Puppenhülle nicht verlassen. Dadurch waren sie an der Meconium-Abgabe verhindert. Normale Tiere geben kurz nach dem Schlüpfen oder noch in der Puppenhülle während des

Tabelle 3. *Fluoreszenzintensität des Fleckens st bei rot- und gelbflügeligen Parabiose-Tieren und bei Kontrollen*

	Stamm 1 (rotflügelig)		Stamm 13 (gelbflügelig)	
	Kontrolle	Parabiose	Kontrolle	Parabiose
Fluoreszenzintensität .	42	0	350	0

Schlüpfens das Meconium ab. Aus später folgenden Versuchen ergab sich, daß das Meconium alle die Stoffe enthält, die bei den Parabiosepartnern vermehrt auftreten.

Ungeklärt ist dagegen der *Mangel an st*. Dieser Stoff ist auch im Meconium und in Nicht-Parabiose-Tieren in größerer Menge enthalten (Tabelle 3). Er tritt vor allem bei gelbflügeligen Tieren sehr stark auf.

Tabelle 4. *Änderung der Fluoreszenzintensität von Riboflavin mit dem Alter der zur Parabiose verwendeten Puppen. Vergleich der Riboflavin-Konzentration von Parabiosen am letzten Körper-Segment mit solchen am Kopf*

	Parabiose am letzten Körper-Segment			Kopf-Parabiose		
	1	2	4	1	2	4
Alter der zur Parabiose verwendeten Puppen in Tagen	40	70	105	30	105	140
Fluoreszenzintensität						

Aus einer gesonderten Versuchsreihe ergab sich, daß der *Riboflavin-Gehalt* der Imagines mit dem Alter der zur Parabiose verwendeten Puppen ansteigt

(Tabelle 4). Die Versuche wurden nur bei der Mutante *g* durchgeführt. Beide Parabiase-Partner gehörten dem gleichen Stamm an.

Die anderen fluoreszierenden Stoffe zeigten diese oder ähnliche markante Änderungen nicht. Die Zunahme der Riboflavinmenge ist besonders deshalb erstaunlich, weil der Riboflavin-Gehalt normaler Puppen mit dem Alter abfällt (Abb. 11).

3. Quantitative Untersuchungen der fluoreszierenden Stoffe während der Entwicklung. Eier, verschiedene Raupen- und Puppenstadien wurden auf das quantitative Vorkommen der fluoreszierenden Stoffe untersucht.

Besonders auffallend waren die Änderungen bei Riboflavin, Kynurenin und Hydroxy-Kynurenin (Abb. 11).

Das Hauptvorkommen von Riboflavin im Laufe der Entwicklung liegt in Eiern und frisch geschlüpften Raupen. Von diesem Maximum erfolgt ein sprunghafter Abfall, so daß schon bei 2 mm langen Raupen fast kein Riboflavin mehr nachzuweisen ist. Die Konzentration steigt dann mit dem Alter der Raupen langsam wieder an, hat bei Wanderraupen zur Zeit der Verpuppung ein zweites, aber im Vergleich mit dem ersten sehr niedriges Maximum, fällt dann mit dem

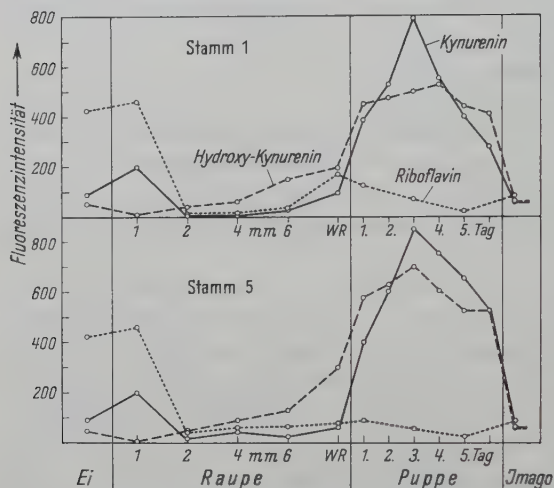


Abb. 11. Konzentration von Kynurenin, Hydroxy-Kynurenin und Riboflavin im Laufe der Entwicklung bei Stamm 1 und bei Stamm 5. — Angegeben sind die Mittelwerte von je 6 Einzelmessungen. — Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität, auf der Abszisse das Alter der Raupen in mm ihrer Länge, das Alter der Puppen in Tagen aufgetragen

Alter der Puppe stetig ab, um kurz vor dem Schlüpfen der Imagines wieder fast ganz zu verschwinden. Der Riboflavin-Gehalt der Imagines entspricht dem von 2 oder 3 Tage alten Puppen.

Umgekehrt wie bei Riboflavin liegen die Verhältnisse bei Kynurenin und Hydroxy-Kynurenin. Diese Stoffe erreichen ihre höchste Konzentration in Puppen. Kynurenin hat ein kleines Maximum bei frisch geschlüpften Raupen, verschwindet dann aber fast vollständig. Erst mit der Verpuppung tritt es wieder auf und erreicht am 3. Puppentag ein hohes Maximum. Zum gleichen Zeitpunkt findet in der Puppe die Augenausfärbung statt. In gleicher Weise wie der Anstieg, erfolgt jetzt ein rapider Abfall der Kynurenin-Konzentration. Der noch kurz vor dem Schlüpfen in Puppen nachweisbare Kynurenin-Gehalt wird im Meconium ausgeschieden. In Imagines kann nur sehr wenig Kynurenin nachgewiesen werden.

Die Konzentration des Hydroxy-Kynurenins steigt während der Raupenentwicklung langsam aber stetig an, erfährt dann mit der Verpuppung wie Kynurenin eine sprunghafte Zunahme und erreicht zwischen dem 3. und 4. Tag der Puppenruhe ebenfalls ein Maximum. Dieses Maximum ist nicht so ausgeprägt wie beim

Kynurenin. Der Hydroxy-Kynurenin-Gehalt bleibt während der ganzen Puppenentwicklung hoch. Erst beim Schlüpfen erfolgt ein Abfall. Hydroxy-Kynurenin wird wie der Rest des Kynurens zum größten Teil im Meconium ausgeschieden. Der Kurvenverlauf der Mutante *g* entspricht weitgehend dem der Wildform.

Von den übrigen fluoreszierenden Flecken zeigen *bl*₁ und *ge* ein gegensätzliches Auftreten (Tabelle 5). In Eiern und Imagines sind beide vorhanden, in Raupen fehlt *bl*₁, in Puppen *ge*.

Tabelle 5. Vorkommen der fluoreszierenden Stoffe *bl*₁ und *ge* in Eiern, Raupen, Puppen und Imagines

	Eiern	Raupen	Puppen	Imagines
<i>bl</i> ₁	+	—	+	+
<i>ge</i>	+	+	—	+

Xanthurensäure, *r* und *s* treten erst kurz vor dem Schlüpfen der Imagines auf.

4. Verteilung der fluoreszierenden Stoffe auf Thorax und Abdomen bei Imagines. Sehr eindrucksvoll ist die hohe Konzentration an *ge* im Thorax (Abb. 12).

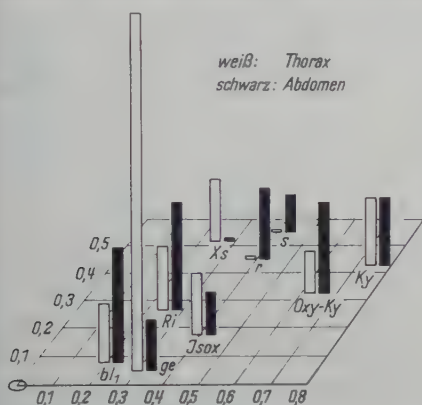


Abb. 12. Fluoreszenzintensität der Flecke zweidimensionaler Chromatogramme vom Thorax (weiße Säulen) und vom Abdomen (schwarze Säulen). Mittelwerte aus 4 Einzelmessungen

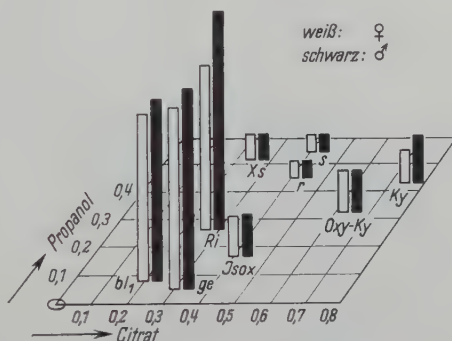


Abb. 13. Fluoreszenzintensität der Flecke zweidimensionaler Chromatogramme von weiblichen (weiße Säulen) und von männlichen (schwarze Säulen) Imagines. Mittelwerte aus 4 Einzelmessungen

Dieser fluoreszierende Stoff überwiegt alle anderen an Intensität. Im Gegensatz zum Thorax ist sein Gehalt im Abdomen sehr gering. Aus der Tabelle 5 könnte man entnehmen, daß *ge* in einem Zusammenhang mit der Muskulatur steht. In Raupen und Imagines ist Muskulatur vorhanden, in Puppen ist sie dagegen zum großen Teil im Umbau begriffen.

Umgekehrt wie *ge*, aber nicht in der gleichen ausgeprägten Form, verhält sich der Stoff *bl*₁, der erst in der Puppe gebildet wird. Bei diesem Fleck ist die Konzentration im Abdomen etwa doppelt so groß wie im Thorax. Im Meconium wird *bl*₁ nicht ausgeschieden.

Während Kynurenin in Thorax und Abdomen in gleicher Konzentration vorliegt, ist Hydroxy-Kynurenin im Abdomen angereichert. Xanthurensäure ist allein im Thorax vorhanden und *r* und *s* gegensätzlich hierzu nur im Abdomen. Weil *r* und *s* außerdem im Meconium ausgeschieden werden, scheint es sich bei diesen beiden Stoffen um Abbau-Produkte zu handeln.

Obwohl Riboflavin vermehrt im Abdomen vorliegt, kann es sicher nicht zu den Stoffwechsel-Endprodukten gerechnet werden. Es wird nicht im Meconium

ausgeschieden. Sein Vorkommen im Abdomen ist auf das Auftreten in bestimmten Abdominal-Organen zurückzuführen.

Unter den in *Eiern* gefundenen fluoreszierenden Stoffen ist der hohe Riboflavin-Gehalt besonders auffallend (Abb. 14). Bei Vergleich mit Abb. 13 zeigt sich, daß die eiertragenden Weibchen trotz der hohen Riboflavin-Konzentration der Eier einen geringeren Riboflavin-Gehalt haben als Männchen. Hiernach scheinen also *Hoden* mehr Riboflavin zu enthalten als Eier.

Außer Riboflavin ist auch Isoxanthopterin in Eiern angereichert. Alle anderen Stoffe haben jedoch im Vergleich mit ganzen Tieren geringe Konzentration. Xanthurensäure, r und s fehlen vollkommen.

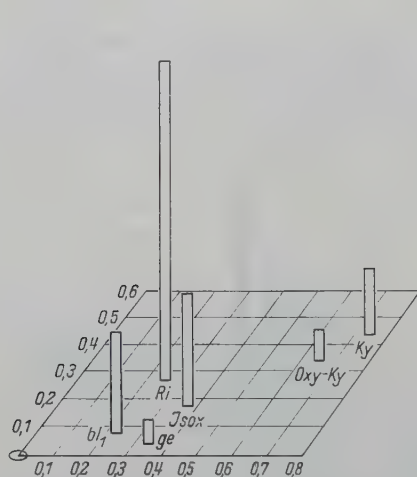


Abb. 14. Fluoreszenzintensität zweidimensionaler Chromatogramme von Eiern. Mittelwerte aus 2 Einzelmessungen

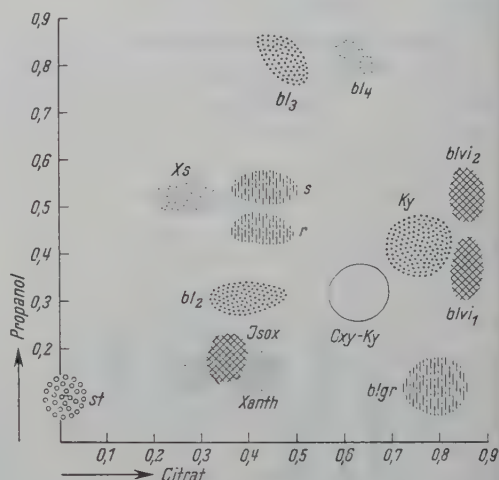


Abb. 15. Schema eines zweidimensionalen Chromatogrammes von Meconien. Signaturen der Fluoreszenzfarben und Fleckenbezeichnungen vgl. Abb. 3

Zwischen weiblichen und männlichen Tieren besteht, abgesehen von dem Riboflavin-Gehalt, kein Unterschied.

5. Meconien. Zur Untersuchung der Stoffwechsel-Endprodukte (WOLFRAM 1949, HADORN und EGELHAAF 1956) wurden Chromatogramme von je 10 Rectalblasen angefertigt, die aus schlüpfreifen Puppen herauspräpariert wurden (Abb. 15). Das Fluoreszenzmuster enthält zahlreiche Flecke, die den Körper- und Flügel-Chromatogrammen fehlen, wie blgr, blvi₁, blvi₂, bl₃, dagegen fehlen bl₁, ge und Riboflavin.

In Meconien ist der stoffliche Unterschied zwischen der Wildform und der Mutante *g* am größten. Zu dieser Untersuchung wurden Stämme gleicher Augenfarbe verwendet, so daß diese an dem unterschiedlichen Auftreten der fluoreszierenden Flecken bei der Wildform und der Mutante *g* nicht ursächlich beteiligt sein kann, wie es z. B. bei der *a*-Mutante von *Ephesia* (HADORN und EGELHAAF 1956) der Fall ist. Aus der Abb. 16 ist die Fluoreszenz-Stärke von blgr und Hydroxy-Kynurenin bei der Mutante zu ersehen. blgr ist bei *g*⁺ kaum vorhanden, und auch der Hydroxy-Kynurenin-Gehalt ist im Vergleich mit der Mutante klein. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem Fleck st. Auch von diesem Stoff hat die Mutante eine erheblich größere Menge als die Wildform. Die übrigen

fluoreszierenden Stoffe kommen bei der Mutante in annähernd doppelter Konzentration vor. Nur Xanthurensäure macht eine Ausnahme: sie wird bei der Wildform in erhöhtem Maße ausgeschieden. Da die beiden besonders auffallenden Stoffe blgr und st chemisch noch nicht identifiziert werden konnten, läßt sich über ihre Beziehung zur Flügelfarbe nichts Näheres sagen.

Meconien von noch nicht ausgefärbten Tieren differieren nicht so auffallend. Die Flecke st, r, blvi₂, bl₃ und bl₄ sind noch nicht vorhanden, und die anderen Stoffe liegen in erheblich niedriger Konzentration vor (Abb. 17).

BECKER (1937) beschrieb das Fehlen von Pterinen in Exkreten pterin-führender Insekten. Bei *Plodia* treten jedoch sowohl Xanthopterin als auch Isoxanthopterin im Meconium auf.

IV. Vergleich von *Plodia* mit anderen Schmetterlingsgruppen

Die bei *Plodia* gefundenen Stoffe wurden durch entsprechende Untersuchungen zum Teil auch bei anderen Schmetterlingsarten festgestellt. Das Vorkommen der einzelnen fluoreszierenden Stoffe ist aus Tabelle 6 zu ersehen. Es wurden nur Imagines zur Untersuchung verwandt.

Bei der Aufstellung dieser Tabelle wurden die einzelnen Arten jeweils als Vertreter ihrer Familie dargestellt. Ob sie als solche gelten dürfen, müssen weitere Versuche an umfangreicherem Material noch klären. Nach Untersuchungen von GROSSBACH (1957) bei Lepidopteren, von MICKS (1954) bei Mücken und von ZIEGLER-GÜNDER (1956) bei Weißfischen scheint es aber unmöglich zu sein, auf Grund biochemischer Unterschiede systematische Einordnungen vorzunehmen.

Bei Betrachtung der Tabelle ist zunächst auffallend, daß bei Vorhandensein von Kynurensäure die Flecke r und s fehlen.

Der rot fluoreszierende Fleck tritt außer bei *Plodia* auch bei *Ephestia* und bei Nymphaliden auf. Zu einer chemischen Identifizierung wäre daher *Vanessa* oder *Araschnia* wegen leichter Materialbeschaffung günstiger. MÜLLER (1955) und GROSSBACH (1957), die auch Nymphaliden untersuchten, haben den rot-

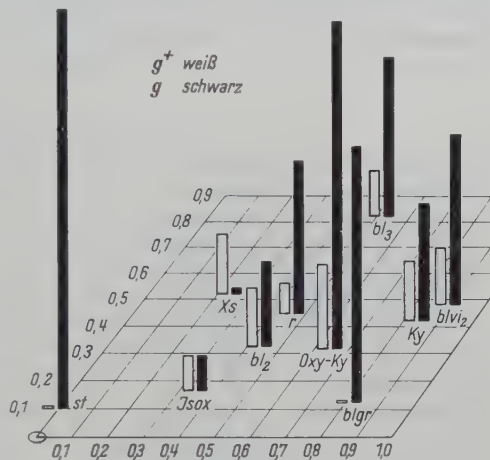


Abb. 16. Fluoreszenzintensität der Flecke zweidimensionaler Chromatogramme von Meconien kurz vor dem Schlüpfen der Imagines. Weiße Säulen: rotflügeliger Stamm 1, schwarze Säulen: gelbflügeliger Stamm 5. — Mittelwerte aus 5–7 Einzelmessungen

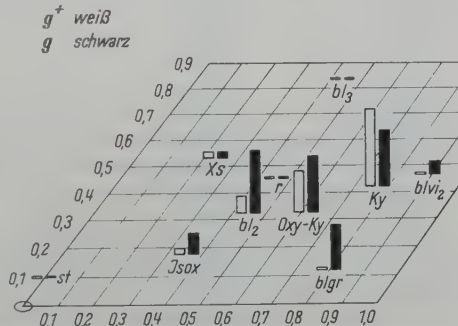


Abb. 17. Fluoreszenzintensität der Flecke zweidimensionaler Chromatogramme von Meconien aus Puppen mit noch nicht ausgefärbten Flügeln. — Weiße Säulen: Stamm 1, schwarze Säulen: Stamm 5

Tabelle 6. Verteilung der fluoreszierenden Stoffe auf Flügel, Thorax, Abdomen und Meconien verschiedener Schmetterlingsgruppen. — Ein Punkt = eindeutig erkennbare Fluoreszenz; zwei Punkte = starke Fluoreszenz; drei Punkte = sehr starke Fluoreszenz. — or in der st-Spalte besagt, daß der gelbe st-Fleck hier orange fluoresziert. gr in der ge-Spalte gibt an, daß neben ge noch ein grüner Fleck erscheint. Die Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3—10 Einzelmessungen. Fleckenbezeichnungen: Xs = Xanthurensäure, Ky = Kynurenin, Kys = Kynurensäure, Oxy-Ky = Hydroxy-Kynurenin, Ri = Riboflavin, Isox = Isoxanthopterin, Xanth = Xanthopterin

		bl ₃	bl ₄	rot	Xs	s	r	blv ₂	Ky	Kys	blv ₁	Oxy-Ky	bl ₂	gr	Ri	Isox	Xanth	st	blgr	ge	bl ₁
PYRALIDAE	Flügel			•	••	•	•							•		•	•			••	•
	Thorax				•				•			•			•	•	•				•
	Abdomen	•				•	•		•			•			•	•	•	•			•
	Meconien	•	•		•		•		•		•	•	•			•	•				•
<i>Ephestia kühniella</i>	Flügel	•		•		•	•		•					•		•	•			•	•
	Thorax	•		•											•	•	•			••	•
	Abdomen	•				•	•		•		•	•				••	•	•	•		••
NYMPHALIDAE	Flügel	•		•	•				•		•	•				•	•			•	•
	Thorax								•			•				•	•	or		••	•
	Abdomen								•							•	•			••	
	Meconien	•		•				•		•	•	•	•			•	•		•		
PIERIDAE	Flügel							•	•					•	•	•	•				
	Thorax								•			•				•	•			•	•
	Abdomen								•			•				•	•	•	•		•
PAPILIONIDAE	Flügel	•				•		•	•					•		•					
NOTODONTIDAE	Flügel	•							•						•						•
	Thorax	•										•				•	•			•	•
	Abdomen	•							•												
	Meconien	•							•			•				•					
SPHINGIDAE	Flügel				••				•						•	•					
	Thorax				••				•	•					•	•				•	•
	Abdomen	•			••				•	•		•				•	•			•	•
GEOMETRIDAE	Flügel				••									••		•					•
	Thorax	•			••									••	••					•	•
	Abdomen				••										••	•				•	•
<i>Geometra (unbest.)</i>	Flügel	••			••				•							•					
ARCTIIDAE	Vorderflüg.				•		•													•	•
	Hinterflüg.											•					•	•		•	•
	Thorax				•										•				••	••	
NOCTUIDAE	Flügel						•									•	•			•	•
	Thorax							•							••		•		••	••	
	Abdomen				•					•					•				•	•	•
<i>Agrotis pronuba</i>	Flügel				•									•		•				gr	
	Thorax				•										••	•			•	••	
	Abdomen				••	•									••	••			•	•	
LASIOCAMPIDAE	Flügel	•					•	•							•					•	•
	Thorax				•			•							••				•	••	
	Abdomen							•	•							••			•	•	

fluoreszierenden Stoff nicht beschrieben, weil er nur in Flügeln und Meconien auftritt (GROSSBACH untersuchte nur Köpfe, MÜLLER Körper ohne Flügel). Auch

benutzten sie als Laufmittel der zweiten Dimension in ihren Chromatogrammen Collidin, in dem der rot-fluoreszierende Stoff nur bei sehr hoher Konzentration erscheint.

Der Fleck gr tritt besonders stark bei *Geometra vernaria* auf. Dessen grüne Flügelfarbe kann aber nicht auf diesen Fleck zurückgeführt werden, da gr auch bei der nicht grünen *Plodia* und der ebenfalls nicht grünen *Ephesia* vorkommt. Zur chemischen Untersuchung wäre *Geometra vernaria* wegen der hohen Konzentration an gr geeigneter als *Plodia*.

Bei Geometriden erscheint noch ein weiterer grün fluoreszierender Fleck, der aber auch nichts mit der grünen Flügelfarbe von *G. vernaria* zu tun hat, da er ebenso bei nicht grünflügeligen Geometriden vorliegt. (Der Fleck ist in der Tabelle nicht angeführt. Er liegt im Chromatogramm unter der Xanthurensäure.) Das alleinige Vorkommen des grün-fluoreszierenden Fleckes bei Geometriden spricht aber für spezifische Unterschiede zwischen verschiedenen Familien.

Daß spezifische Unterschiede zwischen verschiedenen Familien bestehen, beweisen auch die Nymphaliden. Von diesen wurden mehrere Arten untersucht: *Vanessa io*, *V. urtica*, *Araschnia levana* und *Polygonum c-album*. Sie besaßen alle das gleiche Fluoreszenz-Muster.

Weitere Differenzen im Auftreten der verschiedenen Stoffe sind folgende:

In den Familien der Pieriden, Papilioniden und Notodontiden fehlt Xanthurensäure, während diese bei Sphingiden und Geometriden in besonders hoher Konzentration vorhanden ist.

Kynurenin kommt bis auf Noctuiden allgemein vor. Hydroxy-Kynurenin fehlt dagegen häufiger, z. B. bei Papilioniden, Geometriden, Noctuiden und Lasiocampiden. bl₂ und bl₄ scheinen mit einer Ausnahme (Nymphaliden) für *Plodia* spezifisch zu sein.

Riboflavin, Isoxanthopterin, blgr und ge kommen in allen Familien vor. Interessant ist, daß gerade der allgemein verbreitete Fleck blgr bei *Plodia* nur in der *g*-Mutante in meßbarer Menge auftritt. Ähnlich ist es mit Fleck st, der bei *Ephesia* und Nymphaliden (hier allerdings nicht gelb sondern orange) vorhanden ist und bei *Plodia* nur in der *g*-Mutante erscheint.

Zwischen Pyraliden und Nymphaliden scheint biochemisch ein näherer Zusammenhang zu bestehen, da außer st auch der rot-fluoreszierende Fleck und bl₂ nur bei diesen beiden Familien auftritt.

Ausgedehntere Versuche würden in dieser Richtung sicher manche Aufklärungen bringen.

C. Diskussion

Die Mutante *g* greift in verschiedene Stoffklassen hemmend oder fördernd ein. Die auffallendste Änderung ist die Bildung der gelben anstatt der roten Flügelfarbe. An fluoreszierenden Stoffen fehlen Xanthurensäure und gr im gelben Flügel, während r und s verstärkt auftreten. Im Körper ist die Mutante durch das besonders starke Vorkommen von st charakterisiert. Im Meconium sind alle Stoffe in größerer Konzentration vorhanden. Von diesen Stoffwechsel-Endprodukten interessieren vor allem Kynurenin und Hydroxy-Kynurenin. Xanthurensäure tritt im Gegensatz zu Körpern und Flügeln im Meconium auch auf, jedoch im Vergleich mit der Wildform in sehr geringer Menge.

und Kynurenin im Meconium spricht für einen veränderten Tryptophan-Stoffwechsel bei der Mutante *g*.

Auffallend ist der Farbumschlag des roten Flügelfarbstoffes bei verschiedenem p_H . Der gelbe Flügelfarbstoff zeigt gleiches Verhalten erst nach der Extraktion aus den Flügeln.

Der rote bzw. gelbe Flügelfarbstoff konnte keiner der bekannten Farbstoffgruppen zugerechnet werden.

Im Körper treten mehr und andere Stoffe auf als im Flügel, unter anderen Kynurenin und Hydroxy-Kynurenin.

Im Laufe der Entwicklung vom Ei bis zur Imago zeigt Kynurenin einen zweimaligen Anstieg seiner Konzentration: erstens bei frisch geschlüpften Raupen, zweitens bei 3 Tage alten Puppen. Hydroxy-Kynurenin hat nur ein Maximum am dritten Puppentag. Da zu diesem Zeitpunkt die Augenausfärbung der Imagines beginnt, scheint das erhöhte Auftreten hiermit zusammenzuhängen. Die bis zum Schlüpfen der Imagines verhältnismäßig große Menge an Kynurenin und Hydroxy-Kynurenin wird im Meconium ausgeschieden.

Im Meconium sind starke Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante *g* erkennbar. Allgemein scheidet *g*-*Plodia* quantitativ mehr fluoreszierende Stoffe aus als *g*⁺. Ferner kommen bei *g* Stoffe vor, die bei der Wildform fehlen, wie st und blgr.

Ein Vergleich der fluoreszierenden Stoffe von *Plodia* mit anderen Lepidopteren zeigt spezifische Unterschiede, die wahrscheinlich taxonomisch verwertbar sind.

Literatur

- BARNICOT, N. A.: The pigment trichosiderin from human red hair. *Nature* (Lond.) **177**, 528 (1956). — BECKER, E.: Das Fehlen der Pterine in den Exkrementen pterinführender Insekten. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **246**, 177 (1937). — Farbstoffe der Insekten. *Embryol. Rdsch.* **1937**. — BUTENANDT, A.: Über Ommochrome, eine Klasse natürlicher Phenoxazon-Farbstoffe. *Angew. Chem.* **69**, 16 (1957). — CHEN, P. S., u. A. KÜHN: Vergleichende Untersuchungen der freien Aminosäuren und Peptide während der Raupen- und Puppenentwicklung verschiedener Genotypen von *Ephestia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **11b**, 305 (1956). — DANNEEL, R., u. B. ZIMMERMANN: Über das Vorkommen und Schicksal des Kynurenins bei verschiedenen *Drosophila*-Rassen. *Z. Naturforsch.* **9b**, 788 (1954). — DUEWELL, H., I. P. E. HUMAN, A. W. JOHNSTON, S. F. McDONALD and A. R. TODD: Colouring matters of Aphididae. *Nature* (Lond.) **162**, 759 (1948). — EGELHAAF, A.: Photolabile Fluoreszenzstoffe bei *Ephestia kühniella*. *Naturwissenschaften* **43**, 309 (1956). — Fluoreszierende Stoffe in den Organen dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 769 (1956). — GROSSBACH, U.: Zur papierchromatographischen Untersuchung von Lepidopteren-Augen. *Z. Naturforsch.* **12b**, 462 (1957). — HADORN, E., u. A. EGELHAAF: Biochemische Polyphanie und Stoffverteilung im Körper verschiedener Augenfarb-Genotypen von *Ephestia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **11b**, 21 (1956). — HADORN, E., u. A. KÜHN: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphanie von Augenfarb-Genen bei *Ephestia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **8b**, 582 (1953). — HADORN, E., and H. K. MITCHELL: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paperchromatography. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **37** (1951). — HELLMANN, H.: Papierchromatographische Trennung von Tryptophan, Oxy-Tryptophan, Kynurenin und 3-Oxy-Kynurenin. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **287**, 205 (1951). — KIKAWA, H.: Mechanism of pigment formation in *Bombyx* and *Drosophila*. *Genetics* **26**, 585 (1941). — KÜHN, A.: Ein Fluorometer für Papierchromatogramme. *Naturwissenschaften* **42**, 529 (1955). — LEA, A. J.: Solubility of Melanins. *Nature* (Lond.) **170**, 709 (1952). — MEHLER, A. H.: Metabolism of Tryptophan. Symposium of Amino acid Metabolism 1955. — MICKS, DON W.: Paper Chromatography as a tool for mosquitos Taxonomy: the *Culex*

Pipiens Complex. Nature (Lond.) **174**, 217 (1954). — MÜLLER, G.: Fluoreszierende Stoffe in *Vanessa io* chromatographisch untersucht. Z. Naturforsch. **11b**, 221 (1956). — NEEDHAM, A. E., and P. C. J. BRUNET: The integumental pigment of *Asellus*. Experientia (Basel) **18**, 207 (1957). — PAECH, K., u. M. V. TRACY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — SCHMIDLI, B.: Über Melanine, die dunklen Haut- und Haarpigmente. Helv. chim. Acta **38**, 1078 (1955). — SCHÖPF, C., u. E. BECKER: Über neue Pterine. Justus Liebigs Ann. Chem. **524**, 49 (1936). — SCHWARTZ, V.: Zur Phänogenese der Flügelzeichnung von *Plodia interpunctella*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 51 (1953). — THOMMSEN, M.: I. The pigments of Butterflies wings: *Melanargia galatea*. Biochem. J. **20**, 73 (1926). — II. The pigments of Butterflies wings: occurrence of the pigment of *Melanargia* in *Dactylus glomerata*. Biochem. J. **20**, 1026 (1926). — UMEBACHI, Y., and K. TSHUCHITANI: The presence of Xanthurenic-acid in the fruit-fly *Drosophila melanogaster*. J. Biochem. **42**, 817 (1955). — VISCONTINI, M., E. HADORN u. P. KARRER: Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*: Die roten Augenfarbstoffe. Helv. chim. Acta **40**, 579 (1957). — VISCONTINI, M., A. KÜHN u. A. EGELHAAF: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 501 (1956). — VISCONTINI, M., E. LÖSER u. A. EGELHAAF: Oxydation der Pterine HB_2 aus *Drosophila* und *Ephestia* durch UV-Bestrahlung. Naturwissenschaften **43**, 379 (1956). — VISCONTINI, M., M. SCHÖLLER, E. LÖSER, P. KARRER u. E. HADORN: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. Helv. chim. Acta **38**, 397 (1955). WISS, O., u. H. HELLMANN: Über die Einführung phenolischer Hydroxylgruppen beim oxydativen Tryptophan-Stoffwechsel. Z. Naturforsch. **8b**, 70 (1953). — WOLFRAM, R.: Über die Histogenese der Exkretpigmente bei verschiedenen Rassen von *Ptychopoda seriata* und *Ephestia kühniella*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 254 (1949). — ZIEGLER-GÜNDER, I.: Untersuchungen über die Purin- und Pterin-Pigmente in der Haut und in den Augen der Weißfische. Z. vergl. Physiol. **39**, 163 (1956). —

ELISABETH MÖHLMANN, Chemisches Institut der Universität Zürich, Zürich (Schweiz)

Zoology Dept., Columbia University, New York 27, N.Y.

A STUDY OF THE MECHANISM OF RESISTANCE TO ULTRAVIOLET LIGHT IN A STRAIN OF *NEUROSPORA CRASSA*

By

FRED GOODMAN*, **

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 7. Juni 1958)

In 1946, WITKIN described a radiation resistant strain of *Escherichia coli* strain *B* which was designated *B/r*. Since that time, various studies have appeared comparing the two strains as to response to radiation (WITKIN 1947; ZELLE and HOLLAENDER 1954), reactivation effects (ANDERSON 1951; ROBERTS and ALDOUS 1949; LATARJET and CALDAS 1952), biochemistry (MORSE and CARTER 1949) and mutational response to irradiation (WITKIN 1951; DEMEREC and LATARJET 1946). In all these studies, no difference between the strains has been found, to which the changed radiation resistance can be attributed.

The present work describes the isolation and characterization of a radiation resistant strain of *Neurospora crassa*. This organism was chosen for the present work because the kinetics of inactivation, as studied by ATWOOD and NORMAN (1949) and NORMAN (1951, 1954) appear to be relatively simple and a biological basis for the inactivation kinetics has been proposed. The inactivation of conidia has been attributed to inactivation of the nucleus, or a cellular entity present in the conidium in a 1:1 relationship with the nuclei (NORMAN 1951, 1954), and an indication that the entity may be the nucleus itself has been found (ATWOOD 1954).

It was thought that isolation of a radiation resistant mutant would allow analysis of the mechanism of resistance and would also serve as an independent test of the ATWOOD and NORMAN interpretation of the kinetic data.

Methods and Materials

The ultraviolet radiation resistant strain to be described was isolated from strain *22p^{em}fl-2A*, a pantothenate requiring, microconidial strain of *Neurospora crassa*. The parental strain served as the control in all experiments. Strain *1A*, a wild type, was used as the macroconidial strain. All stocks were maintained on Freis minimal agar slants to which had been added suitable concentrations of the required growth factor (RYAN 1950).

For the heterokaryon experiments, the two strains to be combined were inoculated together on minimal agar slants and allowed to develop for six days. Conidia from the slants were inoculated onto the surface of minimal agar in Petri plates and hyphal tips isolated after 12 to 24 hours of incubation at 30° C. (RYAN 1950). Cultures grown from the hyphal tip isolates were used for the experiments.

* Public Health Service Predoctoral Research Fellow of the National Cancer Institute.

** This work was supported in part by an American Cancer Society grant recommended by the Committee on Growth of the National Research Council and by a research grant from the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service, administered by Professor F. J. RYAN, Columbia University.

Stocks, grown on 50 ml. of supplemented minimal agar in 250 ml. Erlenmeyer flasks for six days at 30° C., were used for the irradiation experiments. To harvest conidia, distilled water was added to the flask and the surface of the culture scraped with a glass rod. The resultant suspension was filtered through glass wool to eliminate mycelial fragments. The filtrate was washed twice with distilled water by successive centrifugations and resuspensions, and the conidia were finally resuspended in distilled water to give a concentration of approximately 10^6 conidia per cc. Microscopic examination of both fresh and stained samples from such suspensions showed them to be virtually free from mycelial fragments.

Irradiations were carried out on 10 cc. of suspension in a Petri plate. The Petri plate was placed on a turntable tilted at a 10° angle from the horizontal and rotated at approximately 40 rpm. The ultraviolet light source was a 30 inch Westinghouse sterilamp (No. 728L-30) placed at a distance of five inches from the surface of the turntable. Under these conditions, radiation intensity is approximately 46 ergs/sec./mm² as determined by biological calibration of the lamp using *E. coli* strain B as the biological standard. Samples of the irradiated suspension were removed at appropriate intervals and immediately diluted into distilled water for subsequent platings to determine survival levels. This method requires interruption of the irradiation for the times necessary to remove samples. Comparison of survival curves obtained by this method and by uninterrupted irradiation of separate samples showed no significant differences. Irradiation and subsequent handling of samples was done under low intensity yellow light to obviate photoreactivation.

Specific procedures for a given experiment, where they differ from the methods outlined above, will be presented in the section on experimental results.

Experimental Results

Culture Conditions

Previous experience, in both this laboratory and others, has shown that the viability of conidia from microconidial strains of *N. crassa* is poor. GILES (1951) reported that the use of glycerol instead of sucrose, as a carbon source, increases the yield of viable microconidia. An experiment was performed to determine optimum conditions for conidial yield and viability in the strain to be used.

Table 1. *Culture Conditions*

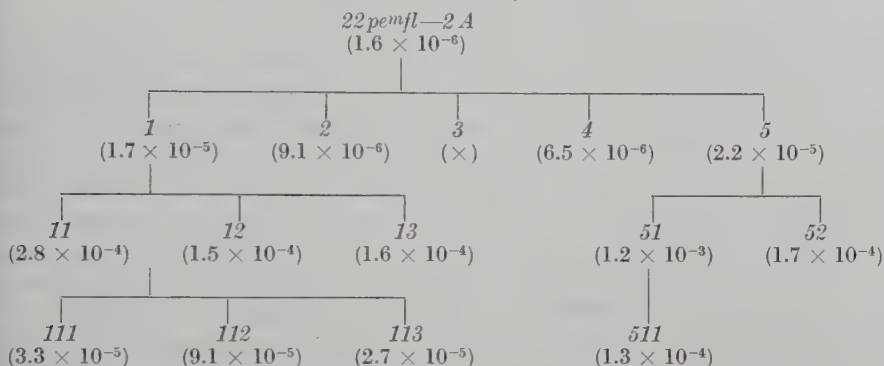
Carbon source	Age of culture (days)	Total count	Viable count	Percent viability
Sucrose	3	7.5×10^5	1.2×10^4	1.6
	6	6.6×10^7	6.3×10^5	1.0
	10	2.8×10^7	1.2×10^5	0.4
	13	2.0×10^7	1.0×10^4	0.1
Glycerol	3	1.6×10^6	9.7×10^4	6.1
	6	2.0×10^7	1.8×10^5	0.9
	10	1.7×10^7	2.8×10^5	1.7
	13	2.6×10^7	2.5×10^5	1.0

Cultures of the sensitive strain were inoculated on media containing either 1% sucrose or 1% glycerol as the carbon source, so as to yield cultures of various ages on a given day. Each culture was harvested and washed in the standard manner and the conidia resuspended in 10 cc. of distilled water. Total counts were made on samples from

each suspension and appropriate dilutions were plated to determine viable counts. The results are summarized in Table 1. Maximum total count is reached after six days of incubation. Percent viability decreases with time in the sucrose grown cultures but is stable at about 1% in the glycerol cultures. Standard conditions for growth were set as six days incubation on sucrose. Estimates of viability ranged from 1% to 20% during the course of the experiments. An attempt at selection for improved conidial viability was unsuccessful.

Isolation of Resistants

The sensitive strain was grown and harvested under standard conditions. Conidia were subjected to 15 minutes of U.V. irradiation and 1 cc. of the irradiated suspension plated in each of eight Petri dishes. Survival level was determined and five single colonies were isolated to flasks and grown under standard conditions. The irradiation procedure was repeated on each of the cultures and several colonies picked from those cultures having the highest survival level. This method was repeated for a total of four successive irradiations. The results are presented in Table 2.

Table 2. *Isolation of Resistant*

Italic numerals refer to isolate numbers. The value in parentheses under each isolate number is survival at 15 minutes of irradiation. Methods are discussed in the text. Isolate 3 was lost during preparation for irradiation.

The survival values obtained are useful only as a basis for comparison within each experiment since the lamp used for irradiation differed from the one used for the kinetic data to be presented and since conditions of irradiation were not carefully controlled.

The isolate used for the subsequent work is the one designated as *112*. Tests of isolate *511* proved it to have the same survival characteristics as *112* but its use was made inconvenient because of extremely poor viability. Inspection of stained conidial preparations from strain *511* indicates that 95% of the conidia lack a nucleus, or at least, have nuclei which do not stain with azure A under conditions which give good nuclear staining in the other strains tested. A stock of isolate *511* has been maintained but no further work has been done with it.

Crystal Violet Resistance

BRYSON has reported that U.V. resistant mutants of *E. coli* B are also resistant to nitrogen mustard, crystal violet, and several other chemical compounds (BRAUN 1953). Cross resistance to crystal violet was tested in the U.V. resistant mutant obtained in this study. Reaction to crystal violet was tested in two ways. In the first, or plating method, conidia of the sensitive and resistant strains were plated into agar containing various concentrations of crystal violet, and colony counts were made after five days of incubation. The second, tube

method, consisted of incubating conidial suspensions in distilled water containing either 10^{-3} or 10^{-4} percent crystal violet. After 22 hours of incubation at 30°C . the suspensions were centrifuged and washed three times and the final suspensions plated on normal medium. Survival values were based on control counts of conidia incubated in liquid under the same conditions as the experimentals except for the absence of crystal violet. It is apparent from Fig. 1, that as in *E. coli*, the radiation resistant mutant of *N. crassa* is cross resistant to crystal violet. This may be taken as an indication that the mechanisms of inactivation are similar in the two organisms.

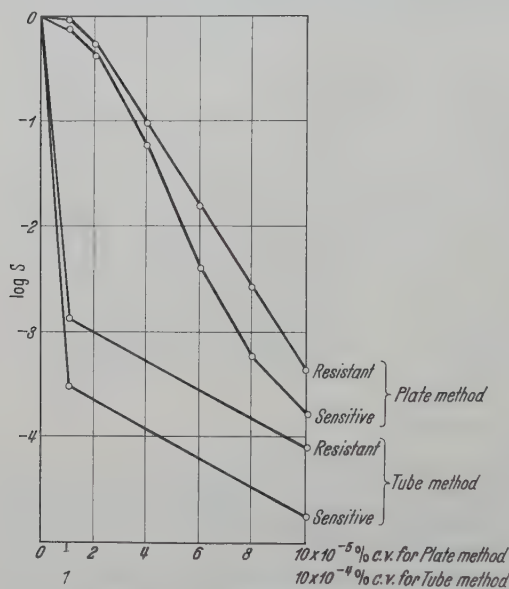


Fig. 1. Crystal violet dose-survival curves. Methods are described in the text

Genetics of Resistance

Attempts at elucidating the mode of inheritance of the resistance character were unsuccessful due to an unanticipated sterility of the microconidial strains both in crosses to other microconidials and in crosses to macroconidial strains. The effects of the resistance character on heterokaryons was tested by making heterokaryons between the resistant or sensitive microconidial strain and a lysineless macroconidial strain (4545A). Conidia of the two heterokaryons

were irradiated and samples receiving different doses were plated on minimal medium and on pantothenate supplemented medium. The data, presented in

Table 3. Survival of Heterokaryons

Plating medium		Minimal		Pantothenate	
survival of		sensitive	resistant	sensitive	resistant
dose (sec.)					
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
20	8.73×10^{-1}	7.23×10^{-1}	8.47×10^{-1}	7.55×10^{-1}	
40	6.82×10^{-1}	—	6.36×10^{-1}	5.91×10^{-1}	
60	3.68×10^{-1}	4.87×10^{-1}	6.01×10^{-1}	5.25×10^{-1}	
80	1.26×10^{-1}	2.30×10^{-1}	2.44×10^{-1}	3.10×10^{-1}	
100	5.50×10^{-2}	8.75×10^{-2}	1.14×10^{-1}	1.35×10^{-1}	
120	1.96×10^{-2}	3.30×10^{-2}	4.83×10^{-2}	4.37×10^{-2}	
140	4.91×10^{-3}	7.87×10^{-3}	1.41×10^{-2}	1.54×10^{-2}	
160	2.05×10^{-3}	2.17×10^{-3}	3.31×10^{-3}	2.59×10^{-3}	

Table 3, indicate there is little, if any, difference in the survival pattern between heterokaryons containing resistant or sensitive components. The resistance character, therefore, behaves as a recessive.

Heterokaryon Survival

ATWOOD (1954; ATWOOD and MUKAI 1954) has pointed out that if inactivation of conidia takes place through inactivation of nuclei, the survival of heterokaryons should approximate the expression $S^2/2$, where S is total survival on doubly supplemented medium. This formulation is based on the fact that heterokaryosis requires the presence of at least two nuclei. The frequency of survival of two nuclei in a conidium is the square of the probability of survival of one nucleus. Assuming a 1:1 ratio of the two different types of nuclei in the heterokaryon, 50% of conidia containing more than one viable nucleus should be heterokaryotic.

A direct test of this hypothesis was made possible by the use of the system to be described. An amycelial variant of the sensitive strain used in these experiments was isolated among the survivors of a 150 second dose of irradiation. A heterokaryon was made between this pan⁻ amycelial and a niacin⁻ albino macroconidial (4540-4637A). Plating conidia from this heterokaryon gives

Table 4. *Amycelial Heterokaryon*. Titer $\times 10^{-5}$

Colony morphology	Minimal	Pantothenate	Niacin	Pan Niacin
Normal . .	80.5	83.5	327	333
Amycelial . .	0	25.0	0	18
Total	80.5	108.5	327	351

$$\text{Heterokaryons} = \text{minimal count/total count} = 0.23$$

segregation of the three expected classes, all three types being easily recognizable on a medium containing both pantothenate and niacin. The pan⁻ homokaryons are of distinct morphology, the heterokaryons are of normal morphology with colored conidia and the niacin⁻ homokaryons are of normal morphology but are albino. The validity of characterization is illustrated by the results noted in Table 4. The data in Table 4 were obtained by classifying for colony morphology after four days of incubation at 30° C. All data may be obtained from the double supplement plates by incubating the plates for approximately one week, which allows the normal colonies to conidiate, and then classifying for color as well as colony morphology. Characterization is simplified by plating conidia in a thin surface layer of agar poured over previously poured plates as in the soft agar technique for phage work. Classification for color of three individual double supplement plates from the above experiment yielded the data presented in Table 5. It is apparent that this method of estimating the proportion of heterokaryotic conidia in the population is in good agreement with the estimates obtained in the standard manner.

Table 5. *Frequency of Heterokaryons on Double Supplement*

Colored No.	Total counted	Colored (%)
22	92	23.9
22	80	27.5
19	82	23.2
		Mean 24.9

To determine whether or not conidial inactivation is due to inactivation of nuclei, conidia of the amycelial heterokaryon were subjected to varying doses

of irradiation and plated on doubly supplemented medium. Colonies were classified for morphology and color to determine survival of the heterokaryotic conidia and the survival obtained compared to predicted survival. The factor 2.55 was divided into S^2 to correct for the actual number of heterokaryons obtained at zero dose.

Table 6. *Survival of Amycelial Heterokaryons*

Dose (sec.)	S_{total}	(E) $S^2/2.55$	(A) S_{het}	A/E	Hets (%)
0	1.00	3.92×10^{-1}	3.92×10^{-1}	1.00	39
50	7.28×10^{-1}	2.08×10^{-1}	2.55×10^{-1}	1.23	35
100	1.76×10^{-1}	1.21×10^{-2}	4.40×10^{-2}	3.64	25
150	4.54×10^{-3}	8.09×10^{-6}	7.72×10^{-4}	95.4	17
200	3.30×10^{-5}	4.27×10^{-10}	2.67×10^{-6}	6252	8.1

As can be seen from Table 6, at approximately a dose of 100 seconds a drastic change in survival pattern of the heterokaryotic conidia takes place. The survival of heterokaryons rises gradually above that expected below the 100 second dose and then begins to rise very fast. The simplest explanation for this is that at doses below 100 seconds inactivation takes place primarily through inactivation of nuclei, while at doses above 100 seconds, inactivation of conidia includes non-nuclear inactivation. The last column in Table 6, however, indicates that at doses above 100 seconds the nuclear inactivation still occurs since the proportion of heterokaryons in the population continues to decrease. Furthermore, a plot of percent heterokaryons versus dose indicates that the proportion of heterokaryons in the population decreases at a constant rate after the 50 second dose. This indicates that the process of nuclear inactivation which occurs below the 100 second dose remains active in the high dose portion of the curve, but that a second process which does not inactivate nuclei contributes to inactivation of conidia at doses over 100 seconds.

Photoreactivation

For the photoreactivation experiments, conidia were harvested and irradiated in the standard manner. Each sample of the irradiated culture was diluted 10^{-1} in duplicate. One of the replicate samples was plated immediately and the other

Table 7. *Photoreactivation: Dose Reduction Factors*

Survival	Macroconidia	Resistant	Sensitive
0.50	1.9	1.6	2.5
0.20	1.6	1.8	2.2
0.10	1.6	1.9	2.2
0.05	1.6	1.9	2.2

was exposed to visible light before plating. The light source was a General Electric bulb No. H 250-A5; 93 mounted in front of a curved reflector. The light was filtered through a 2.5% solution of copper sulfate and the tube containing the suspension to be reactivated was placed at the focal point of the light. Under these conditions, 15 minute exposure to visible light causes maximum reactivation. Dose reduction values were obtained directly from the plotted survival curves for the reactivated and non-activated samples. Dose reduction factors at various survival levels are listed in Table 7. The differences found are not significant.

Temperature reactivation does not take place in either of the strains as post-irradiation incubation at temperatures ranging from 20° to 45° C. has no effect on the survival curves.

Cytology of Conidia

Measurement of conidial volume was made on suspensions of conidia in distilled water. The conidia were drawn by tracing projections made with a Bausch and Lomb microprojector (type 42-63-59) and the two major axes of the conidia measured on the drawings. The conidia were considered to be spherical and the average length of the two axes was taken as the diameter for the calculation of conidial volume.

Table 8. Cytology of Conidia

Conidial volume (u ³)	Macroconidia	Resistant	Sensitive
Mean	123.4	17.5	9.7
Mode	63	11.5	9.5
Median	84	9.5	8.5
NuclearNo/conidium			
Mean	2.38	1.24	1.0

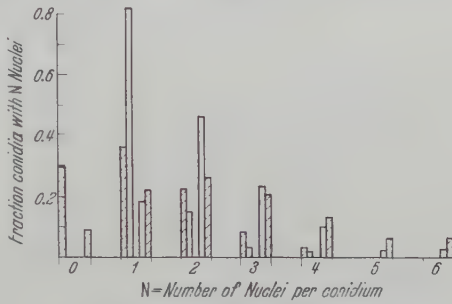


Fig. 2. Nuclear distribution: Cross-hatched bars represent the poisson distribution for $n = 1.2$ (left) and $n = 2.4$ (right). White bars adjacent are actual distributions

Nuclear counts were made on samples prepared by the method NORMAN (1951) describes with the following modifications. Hydrolysis was limited to 5 minutes at 60° C. and the conidia were counter-stained with eosin. Table 8 and Fig. 2 give the values obtained for conidial volume and nuclear number in the various strains. As can be seen, the resistant population differs from the sensitive both in increased mean nuclear number and in mean volume of conidia. If, as HEUBSCHMAN (1952) suggested, volume increases proportionately to the increase in nuclear number, the two differences are two aspects of the same phenomenon.

Table 9. Survival of Conidia exposed to U.V.

Dose	Survival	Standard deviation	g
Macroconidia			
20	0.904	0.039	2.34
40	0.770	0.047	1.47
60	0.566	0.012	0.833
80	0.372	0.069	0.465
100	0.202	0.0045	0.225
150	0.011	0.0052	0.011
200	0.0002	2×10^{-6}	0.0002
Resistant			
20	0.543	0.16	0.782
30	0.230	0.06	0.260
40	0.151	0.10	0.163
60	0.0268	0.016	0.028
80	0.0036	0.0032	0.0036
Sensitive			
20	0.130	0.08	
30	0.0585	0.043	
40	0.0151	0.012	
50	0.0056	0.0048	
60	0.0027	0.0021	

The meaning and derivation of the column marked g is discussed in the text.

Kinetics of Inactivation

Table 9 lists the survival values obtained at various doses of U.V. for the three strains studied. Each value for the microconidial strain is the mean of at

least 10 independent determinations, and each value for the macroconidial represents three independent determinations.

Either of two methods of analysis may be used for the kinetic data. TOBIAS (1950) proposed a model for inactivation which assumes that each haploid genetic complement of the cell has a number of sensitive sites associated with it. The inactivation of any of these sites suffices to inactivate the cell. In polyploid organisms, each of these sites is replicated and all replicas of any site must be inactivated in order to inactivate the cell. The mathematical statement of the

survival curves expected under these assumptions is:

For the haploid

$$S = N/N_0 = e^{-kD}. \quad (1)$$

For the polyploid

$$S = [1 - (1 - e^{-aD})^n]^m \quad (2)$$

where S is the proportion of cells surviving a dose D ; m is the number of sensitive sites per chromosome set; n is the degree of ploidy; a is the average sensitivity of the individual site.

Apply this model to the *Neurospora* data as follows: From the exponential survival curve for the sensitive, the value ma is obtained. Setting n equal to the cytologically determined number of nuclei, various values are substituted for

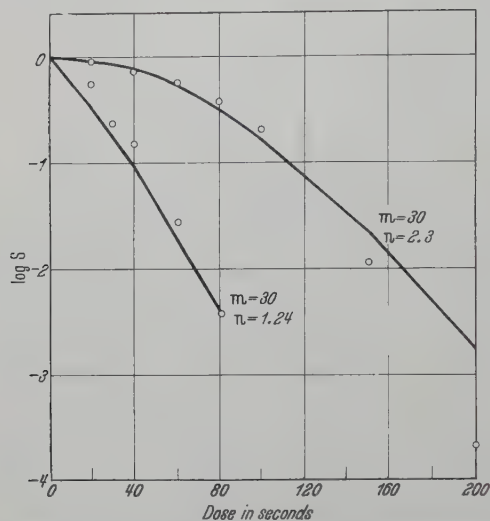


Fig. 3. U.V. dose-survival curves for macroconidia and resistant. Points are experimentally determined; solid lines are theoretical as described in text

m and the resultant curves plotted. The values resulting in the closest approximation to the experimentally determined survival values for the macroconidial are $n=2.3$; $m=30$. But these values fit only the survival points at doses under 100 seconds and yield expected survivals significantly higher than found at the higher doses. The assumption that an additional process causing inactivation occurs at the higher doses can explain this discrepancy.

Inactivation of conidia would then be explained on the basis of each nucleus having approximately 30 sites, each of which is necessary for survival. The difference in survival between sensitive and macroconidial would be attributed to increased average number of nuclei and consequent replication of sites in the macroconidial. Application of this model to the resistant requires the assumption that $n=1.24$ and $m=30$. The resultant curve is a poor fit to the survival points for the resistant (Fig. 3).

If this type of analysis is adopted, irrespective of the poor fit to the resistant survival curve, it would be concluded that the macroconidia are inactivated by two processes. Since adding a second process to the killing of the resistant would make the expected curve go down even faster than it does, thus decreasing its fit to the experimental data, it would have to be assumed that the second process does not occur in the resistant. This requires the assumption that the second

process is a function of total dose of U.V. and is independent of the survival level reached. If the second process begins to have effect at doses higher than 100 seconds, the sensitive and resistant would not be affected by it. LURIA (1944) proposed this type of effect of U.V. radiation to explain the increase in latent period in irradiated phage.

The second method of analysis of the data is through the use of multi-target theory as developed by ATWOOD and NORMAN (1949). They present the following line of reasoning:

Exponential survival kinetics may be described by the expression

$$S = N/N_0 = e^{-kD}. \quad (3)$$

If each member of the population contains n sensitive units, the survival of any of which is sufficient to insure survival of the cell, the probability that all n units are inactivated may be given by

$$P_{(n)} = (1 - e^{-kD})^n \quad (4)$$

and the survival of organisms is

$$S = 1 - (1 - e^{-kD})^n. \quad (5)$$

As D increases, the terms above the first in the expansion of the exponential term of equation 5 become negligible, and at high dose

$$\log S = \log n - kD. \quad (6)$$

A plot of $\log S$ versus dose then becomes a straight line, at high dose, with a slope of $-k$. Extrapolation of the line back to $D=0$ yields the value $\log n$.

ATWOOD and NORMAN (1949) further show that analysis of multi-component curves is made possible by the use of the g plot. The argument validating the use of the g plot is as follows:

Let $p = e^{-kD}$ be the probability that a unit within the organism survives. Let P be the probability that m units survive within an organism containing a total of n units. Then

$$P_{(m=i)} = \binom{n}{i} p^i (1-p)^{n-i}. \quad (7)$$

As D becomes large, p approaches 0 and

$$P_{(m=i)} = e^{-g} g^i / i! \quad (8)$$

where $g = np = ne^{-kD}$.

The probability that no units survive is

$$P_{(m=0)} = e^{-g} = e^{-ne^{-kD}}. \quad (9)$$

Thus e^{-g} is equated to the fraction of organisms killed and permits solving for g which is the expected number of surviving units per organism.

When D is large

$$\log g = \log n - kD \quad (10)$$

and extrapolation of the line to $D=0$ yields $\log n$.

If there are two classes of sensitive units, with n_1 of the first type and n_2 of the second type, the inactivation of all units of one class inactivating the organism, the following holds true:

Let $P(A)$ represent the probability of the organism surviving process A which affects the class having n_1 number of units and $P(B)$ represent the probability

of surviving process B with n_2 number of targets. The probability that the cell will survive both independent processes is given by:

$$P(AB) = (1 - e^{-g_1})(1 - e^{-g_2}). \tag{11}$$

If n_2 is much greater than n_1 , then at low dose $P(B)$ is approximately 1 and $P(AB)$ approximates $P(A)$. $P(A)$ will approximate $1 - e^{-g_1}$ more or less well depending on the initial distribution of n_1 in the population and on the dose reached before $P(B)$ becomes noticeably less than one. When sufficiently high dose is reached, the probability of survival is the product of the probability of surviving each of the processes.

If inactivation is due to two independent processes, a plot of $\log g = \log [-\ln (1 - S)]$ against dose will form two straight lines. The first line represents the process prevailing at low dose and approximates a slope of $-k_1$. Extrapolating this line to $D=0$

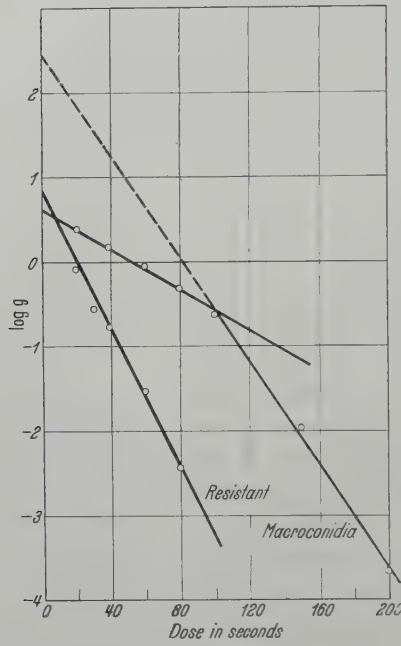


Fig. 4. Plot of $\log g$ vs. Dose

Table 10

	Constants of the g plot			
	n_1	k_1	$n_1 n_2$	$k_1 + k_2$
Macroconidia	4.13	0.027	282	0.070
Resistant . .	—	—	7.75	0.095
Sensitive . .	—	—	—	—

	Survival constants			
	n_1	k_1	n_2	k_2
Macroconidia	4.13	0.027	68	0.043
Resistant . .	2.1	0.052	3.7	0.043
Sensitive . .	1.0	0.058	1.0	0.043

yields the value n_1 ; the second line represents the combined processes, having a slope of $-(k_1 + k_2)$ and extrapolates to $n_1 n_2$ at $D=0$.

It is apparent from the mathematical argument that the validity of the g plot depends on there being a distribution of nuclei in the conidia. The closer the distribution approaches a Poisson, the longer the straight line portion of the curve will be. The data in Fig. 2 indicate that the g plot may be used to evaluate the macroconidial and the resistant survival curves but is not applicable to the sensitive curve. Plots of g for the macroconidial and resistant strains are presented in Fig. 4 and the parameters of the curves derived from this plot are presented in Table 10. Only the high dose points for the resistant are used.

The values of the constants indicated in Table 10 are derived in the following manner: For the macroconidial strain, n_1 and k_1 are determined directly from the low dose portion of the g plot. n_2 is obtained by dividing the high dose intercept by n_1 , and k_2 is obtained by subtracting k_1 from the slope of the high dose portion of the curve. For the resistant strain it is assumed that the slope and intercept obtained correspond to the combined action of the two inactivation processes. Since n_1 , as determined by the g plot for the macroconidial is 1.7

times the cytologically determined number of nuclei, the same factor is multiplied by the observed number of nuclei for the resistant strain in order to obtain n_1 for this strain. The k_1 value is obtained by holding k_2 constant at the macroconidial value and subtracting this value from the observed slope.

n_1 values are thus considered to be a function of nuclear number. n_2 may also bear a relationship to a biological property of the conidia. Plotting n_2 against conidial volume approximates a straight line.

The k_1 values are interpreted in the following manner: ATWOOD (1950a) has shown that recessive lethal mutations are induced in *Neurospora* macroconidia, reaching a maximum of 25% at the 20% survival level. This would be at the point in the macroconidial curve where process two becomes effective. He has also shown that few, if any, induced recessive lethals are homologous (ATWOOD 1950b, 1954). Therefore, recessive lethals can inactivate only an insignificant fraction of multinucleate conidia, but undoubtedly play some role in the inactivation of uninucleate conidia. The values attributed to the constants, k_1 , on the basis of the g plot can only be approximations of the true values. The value for the macroconidial includes a proportion of conidia which are inactivated at a

rate higher than the majority of the conidia since they are uninucleate. The values obtained for inactivation are thus average values for the inactivation of uninucleate and multinucleate conidia. If $k_1 = 0.027$ for the macroconidia is taken to be composed of 18% of the uninucleate value of 0.058 and 82% of the multinucleate value, then the value for the multinucleate is 0.017. The resistant k_1 value should then be an average of 82% of the conidia inactivated at the uninucleate rate and 18% at the multinucleate rate, or a value of 0.051. This is in good agreement with the value 0.052 obtained.

The final test of the hypothesis is, of course, whether or not it can predict the observed survival curves. Fig. 5 indicates that the theoretical curves fit the experimental data.

Discussion

Exponential inactivation kinetics have been interpreted as indicating a unimolecular reaction because of the identity of the kinetics of the two processes. This line of reasoning led to the hypothesis that the inactivation of microorganisms, which follows exponential kinetics, is due to a unimolecular reaction. Since the gene is the only molecule in the cell present in only one or two replicas, which can have a profound effect on the economy of the cell, it was assumed that death is due to induction of lethal mutations.

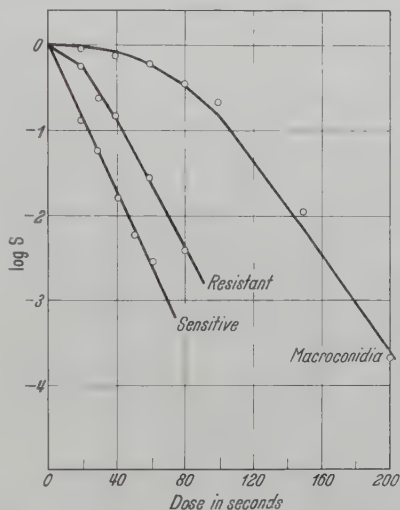


Fig. 5. U.V. dose-survival curves. Points are experimentally determined. Curves are theoretical as described in text

Inactivation of cells need not be due to the inactivation of a single molecule to result in logarithmic kinetics. CLIFTON (1957) points out that the hydrolysis of sugar in acidic solution proceeds with unimolecular kinetics. In this case, the logarithmic nature of the process is due to the fact that only the concentration of sucrose undergoes appreciable change. The inactivation of bacteria by abrasive particles follows unimolecular kinetics (CURRAN and EVANS 1942). It is obvious that all that the logarithmic kinetics indicate here, is that the probability of inactivating a cell per unit time remains constant. The cell is not "softened" to the action of the abrasive by previous, ineffective hits. Therefore, logarithmic kinetics mean only that 1) the concentration of only one of the reactants is undergoing appreciable change; 2) the previous history of the cell does not affect its response to the inactivating agent. Thus, inactivation of cells by exponential kinetics does not necessitate the assumption that inactivation is through the induction of lethal mutation. Any action which meets the two stated requirements can suffice to explain logarithmic kinetics.

What factors are known to contribute to the inactivation of micro-organisms? CASPERSSON (1937) considered lethality to be due to the absorption of ultraviolet light quanta in nucleoprotein because of the action spectrum of the radiation. MOROWITZ (1953) has shown that the action spectrum for the induction of mutation and lethality are similar although the action spectrum for lethality is broader than for mutation. It has been found that reactivating light lowers mutation frequency and raises survival frequency, although these effects are not quantitatively the same (NEWCOMBE and WHITEHEAD 1951). These findings have been interpreted as evidence that lethal mutation can be the cause of inactivation in irradiation studies. KIMBALL (1957) points out that reactivation phenomena indicate that much of the effect of irradiation is mediated through indirect mechanisms and, therefore, similarity of spectra for the two phenomena may indicate only that the chromophores initiating the reactions are the same. There is some direct evidence that lethal mutation is induced by radiation. For example, U.V. induces recessive lethals in *Drosophila* (ALTENBERG 1934) and in *Neurospora* (ATWOOD 1950a, 1954).

That mutation is not the only mechanism causing inactivation can be shown by modifying the lethal or mutagenic effects of irradiation independently of the other effect. DEMEREC and LATARJET (1946) found that the same dose of U.V. induced the same frequency of mutation to T_1 resistance in both strains *B* and *B/r* of *E. coli* although the survival at this dose is very different for the two strains. WITKIN (1951) found *B/r* to mutate to lac^- at twice the rate exhibited by *B* at any given dose. The finding that different loci exhibit different responses to mutagenic agents weakens this as an argument against lethality being due to mutation (ZELLE 1955). Lethal mutations might show a different dose-response curve from the viable mutations studied.

Mutagenic and lethal effects can be separated by means of various post-treatments. BERRIE (1953) found lowered mutation rate and increased inactivation when cells are incubated at 15° rather than at 30° C. following irradiation. BERGER et al. (1953) found that treatment with azide increases both mutagenesis and survival. Further evidence of the same sort has been reported by WAINWRIGHT and NEVILLE (1955).

Similarly, there is evidence both for and against inactivation being a nuclear phenomenon at all. X-ray inactivation data (LUCKE and SARACHEK 1953) indicate that inactivation in a polyploid series of yeast is directly related to the degree of ploidy. SARACHEK's data on U.V. inactivation of yeast indicate that there is some relationship between the ploidy of the strain and the inactivation kinetics, although the relationship is not as simple as the one shown by the X-ray data (SARACHEK and LUCKE 1953; SARACHEK 1954). ATWOOD's (1954; ATWOOD and MUKAI 1954) data on the survival of heterokaryons indicate that inactivation may be due to inactivation of the nucleus per se. NORMAN's (1951, 1954) data indicate that U.V. inactivation of *Neurospora* conidia is a function of nuclear number.

On the other hand, there is some evidence that inactivation of bacteria is not due to nuclear inactivation. The most important evidence along this line is that sectoring of colonies for mutant character occurs at low survival where one would expect no more than one surviving nucleus per cell if killing were through nuclear inactivation (WITKIN 1951; NEWCOMBE 1953).

Evidence has been accumulated recently indicating that irradiation may affect non-nuclear processes in the cell. KIMBALL (1957) has reviewed the evidence for non-genetic killing. Much of the evidence comes from studies of the effects of irradiation on protozoa where the effects of treatment on single cells can be followed. In the ciliates, vegetative death is not the result of normal lethal mutation since the polyploid macronucleus should suppress the expression of such mutations (KIMBALL 1957). HIRSCHFELD et al. (1957) found that high doses of U.V. induce blister formation followed by rupture of the cell surface in *Blepharisma*. NYBOM (1953) found that zero-point killing in *Chlamydomonas* is much higher with U.V. than it is with X-ray treatment. He interpreted this to mean that U.V. killing is primarily non-genetic.

Studies on the biochemical level have indicated that processes other than replication of DNA may be inhibited by radiation. RAVIN and NORMAN (1952), NORMAN (1953) and KAPLAN et al. (1953) found that U.V. inhibits inducible enzyme formation. ERRERA and FICQ (1956) found that U.V. inhibits RNA and protein synthesis in the starfish oocyte. IVERSON and GIESE (1957) found that while only DNA synthesis is stopped immediately by U.V. irradiation of log phase cells of *E. coli*, both RNA and DNA synthesis are inhibited when cells from the stationary phase are irradiated. Finally, VON BORSTELL and MOSER (1956) have found that *Habrobracon* eggs may be inactivated either by inactivation of the nucleus or by inactivation of cytoplasmic constituents.

It is apparent, from the brief summary presented above, that the data on inactivation of organisms is contradictory. However, for a given organism and a given radiation, lethal mutation, nuclear inactivation, and cytoplasmic inactivation may be factors contributing to the inactivation of the organism.

The data reported in this paper are most easily interpreted on the basis of more than one process contributing to the inactivation of *Neurospora* conidia. ATWOOD and PITTINGER (1955) reported that the survival curve of *Neurospora* microconidia irradiated with X-rays requires the assumption that two processes are active. Similar results were obtained by GAFFORD (1957) using gamma rays.

The nature of the second process may be an inactivation of cytoplasmic targets. This assumption is made because of the behavior towards radiation of the amycelial heterokaryon described. At doses below 100 seconds, the survival of heterokaryotic conidia follows the curve predicted on the basis of nuclear inactivation being the cause of conidial inactivation. At doses higher than 100 seconds, survival of heterokaryotic conidia indicates that a second, non-nuclear process becomes active.

Recent studies support the view that U.V. can affect cytoplasmic entities as well as the nuclear material. SARACHEK and TOWNSEND (1953) found that irradiation of yeast to the 1% survival level causes microscopically visible disruption of the mitochondria. VON BORSTELL and MOSER (1956) have obtained direct evidence that inactivation of cells by U.V. may occur through inactivation of cytoplasmic entities. These authors found that irradiation of the nucleus of the *Habrobracon* egg results in exponential survival kinetics while irradiation of the cytoplasm results in a sigmoid curve with a very long threshold.

An alternative to the above hypothesis is that the second process consists of inactivation due to recessive lethal mutation. This hypothesis assumes that once the multinucleate conidium is reduced to its last remaining viable nucleus, the conidium will behave towards irradiation in the same manner as does the uninucleate conidium. This hypothesis has been rejected because the shape of the survival curve that it predicts differs from the experimentally determined curve.

On the basis of the above discussion, inactivation of *Neurospora* conidia by ultraviolet light is considered to be the result of three independent processes. The conidium may be inactivated by some non-heritable inactivation of the nucleus (NORMAN 1951), by the inactivation of a set of cytoplasmic targets, or by the induction of recessive lethal mutations. Inactivation through the induction of recessive lethals occurs only in conidia which are originally uninucleate and is ineffective in multinucleate conidia, due to the presence of the normal gene in the other nuclei of the conidium.

The method of analysis used in this study may be applicable to other data found in the literature. The survival curve of *E. coli* B/r is sigmoidal. If a *g* plot is made on the basis of the published curves, it is found that both the curve published by ANDERSON (1951) and the one published by BRYSON (1948) have low dose intercepts approximating a target number of three. The cytological data indicate that in log phase, these cells have two to four nuclei (PAYNE et al. 1956). The high dose portion of the survival curve indicates a target number of 70 in the case of ANDERSON's data and a target number of 13 in the case of BRYSON's data. The difference in cytoplasmic target number may be attributable to the different conditions of irradiation used. ANDERSON irradiated cells in liquid suspension while BRYSON irradiated cells on the surface of agar. SARACHEK and LUCKE (1953) interpreted their data on the survival of yeast of various ploidies to mean that although there is some relationship between ploidy and the constants of the survival curves, individual strains within one ploidy class show great variation in sensitivity. These differences in sensitivity might be attributable to differing target numbers and sensitivities of the cytoplasmic components.

The existence of cytoplasmic inactivation may be invoked to explain the difference between strains *B* and *B/r* of *E. coli*. SACHER (1954) has pointed out that strain *B* of *E. coli* contains a highly sensitive fraction of cells which are not present in populations of *B/r*. The survival curve of *B* has an upward inflection at a point somewhat above the 1% survival level, and the final slope of the curve is the same as the final slope of the survival curve of *B/r*. Various authors (ANDERSON 1951; HARM and STEIN 1952) have reported that strain *B* is sensitive to heat reactivation while *B/r* shows little response to high temperature. At 46° C. the survival curves for the two strains are indistinguishable. Thus it appears that *B* is susceptible to a type of inactivation which is reactivated by heat, while *B/r* is insensitive to this action of U.V. radiations. Inspection of the survival curves for heat treated, irradiated cells indicates that heat treatment causes the exponential survival curve to become sigmoidal, but does not change the final slope of the curve. This is the type of effect which SARACHEK (1954a) attributes to an increase in cytoplasm during the budding cycle of yeast. If it is assumed that over 90% of the cells in a culture of strain *B* are extremely susceptible to cytoplasmic inactivation, this fraction of the population being absent in strain *B/r*, and that the temperature reactivation affects this cytoplasmic inactivation, the difference between the survival curves of *B* and *B/r* is explained.

An alternative method to the *g* plot for determining whether there is more than one process active in inactivation may be found in the method described by KIMBALL (1953). He described a method for determining target number and inactivation constant, on the basis of the ATWOOD and NORMAN model, which uses all the points in the survival curve. If a second process, with a target number higher than that for the first process, determines the final slope of the curve, the curve should approach this limiting slope more slowly than if only one process were active. Thus, estimating target number by extrapolation of the straight line portion of the curve back to dose 0, will cause an overestimation of target number over the estimate obtained through the use of KIMBALL's method of analysis. The curves published by ZELLE and OGG (1957) extrapolate back to a target number of 5 while the authors indicate that KIMBALL's analysis yields a target number of 2.5. This may indicate that two processes are active in the inactivation of the strain they studied.

As ATWOOD and NORMAN (1949) have indicated, and as has been seen from the data on survival of the resistant strain described in the present work, the recognition of multiprocess inactivation curves depends on the relative magnitudes of the constants for the two processes. Data on inactivation kinetics must, therefore, be interpreted cautiously since true target values may be obscured by modification of simple kinetics by the biological properties of the irradiated population. Kinetic studies may implicate certain mechanisms as contributing to the inactivation produced by irradiation but more direct studies of the intracellular effects of radiations are needed for an understanding of radiation effects.

Summary

1. The isolation of a microconidial strain of *Neurospora crassa* which is resistant to ultraviolet irradiation has been described.

2. The resistance character behaves as though it were recessive in heterokaryons with macroconidial strains.

3. Comparison of the survival kinetics of the resistant strain with the parental microconidial strain, a macroconidial strain, and the survival kinetics of heterokaryons, indicate that inactivation of conidia may be attributed to three independent processes. At low doses of irradiation, conidia are inactivated by inactivation of nuclei, or by induction of recessive lethal mutations. At higher doses, cytoplasmic inactivation is added to the process of nuclear inactivation.

4. The development of resistance to ultraviolet irradiation in *Neurospora* may be attributed to an increase in average number of nuclei per conidium and a concomitant increase in cytoplasmic target number. The latter is directly proportional to the volume of the conidium.

5. The hypothesis of cytoplasmic inactivation has been applied in the analysis of the kinetics of inactivation of other organisms described in the literature.

I should like to express my appreciation to: Prof. F. J. RYAN for his advice and encouragement throughout the course of this work; Mr. F. MUKAI for many interesting discussions, the results of some of which are incorporated in this work; Mr. R. LEVINS for checking the theoretical mathematics contained in this paper; my wife, DEENA, for, among other things, aid in the computations and preparation of the manuscript.

Literature

- ALTENBERG, E.: The artificial production of mutations by ultraviolet light. *Amer. Naturalist* **68**, 491—507 (1934). — ANDERSON, E. H.: Heat reactivation of ultraviolet inactivated bacteria. *J. Bact.* **61**, 389—394 (1951). — ATWOOD, K. C.: The role of lethal mutation in the killing of *Neurospora* conidia by ultraviolet light. *Genetics* **35**, 95—96 (1950a). — The homology patterns of induced lethal mutations in *Neurospora crassa*. *Biol. Bull.* **99**, 332 (1950b). — Ultraviolet effects on *Neurospora* heterokaryons. *Proc. Internat. Photobiol. Congr. Amsterdam*, 1954, p. 143—145. — ATWOOD, K. C., and F. MUKAI: Survival and mutation in *Neurospora* exposed at nuclear detonations. *Amer. Naturalist* **88**, 295—314 (1954). — ATWOOD, K. C., and A. NORMAN: On the interpretation of multi-hit survival curves. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **35**, 696—709 (1949). — ATWOOD, K. C., and T. H. PITTENGER: The relations between the X-ray survival curves of *Neurospora* microconidia and ascospores. *Genetics* **40**, 563—564 (1955). — BERGER, H., F. L. HAAS, O. WYSS and W. S. STONE: Effects of sodium azide on radiation damage and photoreactivation. *J. Bact.* **65**, 538—543 (1953). — BERRIE, A. M. M.: Effects of postirradiation temperature treatment on induced mutations in *Escherichia coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **39**, 1125—1133 (1953). — BORSTELL, R. C. v., and H. MOSER: Differential ultraviolet irradiation of the *Habrobracon* egg nucleus and cytoplasm. In J. S. MITCHELL (ed.), *Progress in Radiobiology*, p. 211—215. London: Oliver & Boyd 1956. — BRAUN, W.: *Bacterial Genetics*. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1953. — BRYSON, V.: The effects of nitrogen mustard on *Escherichia coli*. *J. Bact.* **56**, 423—433 (1948). — CASPERSSON, T.: Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Protoplasma* **27**, 463—467 (1937). — CLIFTON, C. E.: *Introduction to Bacterial Physiology*. New York, N. Y.: McGraw Hill Book Co. 1957. — CURRAN, H. R., and F. R. EVANS: The killing of bacterial spores in fluids by agitation with small inert particles. *J. Bact.* **43**, 125—140 (1942). — DEMEREC, M., and R. LATARJET: Mutations in bacteria induced by radiations. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **11**, 38—49 (1946). — ERRERA, M., and A. FICQ: The effects of ultraviolet light on the protein and nucleic acid metabolism of the different parts of the starfish oocyte. In J. S. MITCHELL (ed.), *Progress in Radiobiology*, p. 3—8. London: Oliver & Boyd 1956. — GAFFORD, R. D.: Lethal effects of gamma radiation on *Neurospora* conidia. Publication 57—61 of the School of Aviation Medicine, USAF, Randolph AFB, Texas, 1—19, 1957. — GILES, N. H.: Studies on the mechanism of reversion in biochemical mutants of *Neurospora crassa*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 283—313 (1951). — HARM, W., u. W. STEIN: Vergleich der UV-Inaktivierung und Warmreaktivierung von verschiedenen UV-empfindlichen Coli-Kulturen. *Naturwissen-*

schaften **39**, 212—213 (1952). — HIRSCHFELD, H. J., A. M. ZIMMERMAN, J. V. LANDAU and D. MARSLAND: Sensitivity of ultraviolet irradiated *Blepharisma undulans* to high pressure lysis. J. cell. comp. Physiol. **49**, 287—294 (1957). — HUEBSCHMAN, C.: A method for varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. Mycologia (N. Y.) **44**, 599—604 (1952). — IVERSON, R. M., and A. C. GIESE: Synthesis of nucleic acid in ultraviolet treated *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta **25**, 62—68 (1957). — KAPLAN, S., E. D. ROSENBLUM and V. BRYSON: Adaptive enzyme formation in radiation-sensitive and radiation-resistant *Escherichia coli* following exposure to ultraviolet. J. cell. comp. Physiol. **41**, 153—162 (1953). — KIMBALL, A. W.: The fitting of multihit survival curves. Biometrics **9**, 201—211 (1953). — KIMBALL, R. F.: Non-genetic effects of radiation on microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. **11**, 199—220 (1957). — LATARJET, R., and L. R. CALDAS: Restoration induced by catalase in irradiated microorganisms. J. gen. Physiol. **35**, 455—470 (1952). — LUCKE, W. H., and A. SARACHEK: X-ray inactivation of polyploid *Saccharomyces*. Nature (Lond.) **171**, 1014—1015 (1953). — LURIA, S. E.: A growth-delaying effect of ultraviolet radiation on bacterial viruses. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **30**, 393—396 (1944). — MOROWITZ, H. J.: The action of ultraviolet light and ionizing radiation on spores of *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. **47**, 325—337 (1953). — MORSE, M. L., and C. E. CARTER: The synthesis of nucleic acids in cultures of *Escherichia coli* strain B and B/r. J. Bact. **58**, 317—326 (1949). — NEWCOMBE, H. B.: The delayed appearance of radiation-induced genetic change in bacteria. Genetics **38**, 134—151 (1953). — NEWCOMBE, H. B., and H. A. WHITEHEAD: Photoreversal of ultraviolet induced mutagenic and lethal effects in *Escherichia coli*. J. Bact. **61**, 243—251 (1951). — NORMAN, A.: Inactivation of *Neurospora* conidia by ultraviolet irradiation. Exp. Cell Res. **2**, 454—473 (1951). — Production of phenocopies in *Aerobacter aerogenes* by ultraviolet radiation. J. Bact. **65**, 151—156 (1953). — The nuclear role in the ultraviolet inactivation of *Neurospora* conidia. J. cell. comp. Physiol. **44**, 1—10 (1954). — NYBOM, N.: Some experiences from mutation experiments in *Chlamydomonas*. Hereditas (Lund) **39**, 317—323 (1953). — PAYNE, J. I., P. E. HARTMAN, S. MUDD and A. W. PHILLIPS: Cytological analysis of ultraviolet irradiated *Escherichia coli*. J. Bact. **72**, 461—472 (1956). — RAVIN, A. W., and A. NORMAN: Studies on non-heritable physiological modification in *Aerobacter aerogenes*. Experientia (Basel) **8**, 108—110 (1952). — ROBERTS, R. B., and E. ALDOUS: Recovery from ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. J. Bact. **57**, 363—375 (1949). — RYAN, F. J.: Selected methods of *Neurospora* genetics. Meth. med. Res. **3**, 51—75 (1950). — SACHER, G. A.: Some characteristics of the ultraviolet survival curves of *Escherichia coli* B and B/r. Radiat. Res. **1**, 559 (1954). — SARACHEK, A.: Ultraviolet inactivation of *Saccharomyces* during the budding cycle. Exp. Cell Res. **6**, 45—55 (1954a). — A comparative study of the retardation of budding and cellular inactivation by ultraviolet irradiation in polyploid *Saccharomyces* with special reference to photoreactivation. Cytologia (Tokyo) **19**, 77—85 (1954b). — SARACHEK, A., and W. H. LUCKE: Ultraviolet inactivation of polyploid *Saccharomyces*. Arch. Biochem. **44**, 271—279 (1953). — SARACHEK, A., and G. F. TOWNSEND: The disruption of mitochondria of *Saccharomyces* by ultraviolet irradiation. Science **117**, 31—33 (1953). — TOBIAS, C. A.: The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. In J. J. NICKSON (ed.), Symposium on Radiobiology, p. 357—384. New York, N. Y.: John Wiley & Sons 1950. — WAINWRIGHT, S. D., and A. NEVILLE: Modification of the biological effects of ultraviolet irradiation by postirradiation treatment with iodoacetate and peptone. J. gen. Microbiol. **12**, 1—12 (1955). — WITKIN, E. M.: Inherited differences in sensitivity to radiation on *Escherichia coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **32**, 59—68 (1946). — Genetics of resistance to radiation in *Escherichia coli*. Genetics **32**, 221—248 (1947). — Nuclear segregation and the delayed appearance of induced mutants in *Escherichia coli*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 357—372 (1951). — ZELLE, M. R.: Radiation induced mutations and their implications on the mechanism of radiation effects on bacteria. In A. KELLNER et al., Symposium on Radiation effects on cells and tissues. Bact. Rev. **19**, 22—44 (1955). — ZELLE, M. R., and HOLLAENDER: Effects of radiation on bacteria. In A. HOLLAENDER (ed.), Radiation Biology, II. New York, N. Y.: McGraw Hill Book Co. 1954. — ZELLE, M. R., and J. E. OGG: Radiation resistance and genetic segregation in a large cell possibly polyploid strain of *E. coli*. J. Bacteriol. **74**, 485—493 (1957).

Dr. FRED GOODMAN, Cell Chemistry Laboratory, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York 32, N. Y.

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen

DIE MUTABILITÄT DER PLASTIDEN VON *ANTIRRHINUM MAJUS* L.
*SIPPE 50**

Von

ROLAND MALY

(Eingegangen am 11. August 1958)

Albomaculate Formen, die auf dem Vorhandensein zweier genetisch verschiedener Plastidensorten beruhen, sind mehrmals beschrieben worden (s. die Zusammenstellung bei CORRENS u. v. WETTSTEIN 1937, S. 49ff.). Selten sind quantitative Angaben über die Häufigkeit des Neuauftretens solcher Schecken, die auf einer Mutation von Plastiden beruhen müssen, in der Literatur zu finden (Tabelle 1).

Tabelle 1

Spezies	Häufigkeit	In %	Referenz
„In <i>Antirrhinum</i> -Kulturen im Jahre 1910“	8 unter rund 30000	0,027	BAUR (1910)
„In den <i>Oenotheren</i> -Kulturen“ (<i>Onagra</i> -Gruppe)	5 unter rund 10000	0,050	RENNER (1936) S. 280
<i>Oenothera odorata</i> und <i>Ber- teriana</i>	5 unter rund 11000	0,045	HAUSTEIN (1938)
<i>Oenothera suaveolens</i>	11 unter 3530	0,312	W. STUBBE (1953) S. 201
<i>Epilobium parviflorum</i>	2 unter 33057	0,006	P. MICHAELIS (1949) S. 83
„Spontanrate bei <i>Epilobium</i> “ .	28 unter 47903	0,058	P. MICHAELIS (1957) S. 155
<i>Epilobium hirsutum</i> (Kontroll- material zu den Mutations- versuchen mit S ⁸⁵ und P ³²)	10 unter 4036	0,248	P. MICHAELIS (1958)

Diese Zusammenstellung von Befunden an verschiedenen Objekten zeigt, daß im allgemeinen nur 2—6 neue Schecken unter 10000 Pflanzen zu erwarten sind. Die relativ hohen „Mutationsraten“ in den Daten von STUBBE bei *Oenothera suaveolens* und MICHAELIS bei *Epilobium hirsutum* lassen vermuten, daß Sippen untersucht wurden, deren Karyotyp die Mutabilität der Plastiden etwas erhöht. Dieser Verdacht ist um so naheliegender, als man bisher nur ein sicheres Mittel kennt, um die Mutabilität der Plastiden drastisch zu steigern: nämlich die Einführung eines geeigneten Genes (RHOADES 1943, ARNASON und WALKER 1949, WOODS und DU BUY 1951, weitere Literatur und über eine ähnliche mutative Genwirkung auf das Plasma bei *Paramaecium* s. MALY 1958b).

Bis auf die jüngste Veröffentlichung von MICHAELIS (1958), die weiter unten besprochen wird, lagen keine Angaben über die Beeinflussung der Mutationsrate der Plastiden durch physikalische oder chemische Mutagene vor, denn die von KNUDSON (1940) und MALY (1951) beschriebenen zahlreichen Plastidenabweichungen bei Farnprothallien sind kernbedingt und gehören nicht hierher, s. MALY (1958a). Daher wurden in den Jahren 1951 und 1952 Versuche mit dem Ziel, die Mutabilität der Plastiden durch Einwirkung von Röntgenstrahlen und Chemikalien zu steigern, begonnen.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Material

Antirrhinum majus Sippe 50 und die Mutanten *drago* (*dra*), *graminifolia* (*gram*), *marmorata* (*marm*) und *nivea* (*niv*). Das Saatgut verdanke ich dem Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

Methode

Alle Plastiden einer *Antirrhinum*-Pflanze stammen von den in der Eizelle enthaltenen Proplastiden ab, da bei der Befruchtung keine Plastiden aus dem Pollenschlauch übertragen werden (BAUR 1910, SCHERZ 1927, MALY unveröffentlicht). Die Bestrahlung von Eizellen vor der Befruchtung erschien daher am günstigsten. Außerdem sollte einer Anregung von MELCHERS folgend versucht werden, die Röntgenstrahlen nicht nur als mutagenes Agens für die Plastiden, sondern auch zugleich als Abtötungsmittel für den Eikern auszunutzen, um über den Weg einer Androgenese die Kombination röntgenbehandeltes Plasma und Plastiden mit unbestrahltem Kern zu erhalten. Darum wurden als Väter solche rezessive Mutanten gewählt, deren Merkmal in F_1 schon in den Keimchalen erkennbar war. Die Androgenese-Häufigkeit ließ sich zwar gegenüber der spontanen Rate von 0,002% (KNAPP 1939) auf 0,006% steigern, aber wie gleich zu sehen sein wird, erwies sich die Maßnahme zur Verringerung des Kerneinflusses auf die Mutabilität der Proplastiden als überflüssig.

Zu den vielen von MICHAELIS (1958) mehrfach erörterten methodischen und theoretischen Voraussetzungen zur Problematik der Plastom-Mutabilität sollte man außerdem eine ganz wesentliche unbedingt bei der Versuchsanstellung beachten: nämlich mit genetisch einheitlichem und wohldefiniertem Ausgangsmaterial zu beginnen. Darum wurden für die hier berichteten Untersuchungen stets nur solche Pflanzen als unbehandelte Kontrollen verwendet, die aus Selbstungen der gleichen Mutterpflanzen stammen, zu gleicher Zeit ausgesät und unter gleichen Bedingungen aufgezogen wurden wie die mit Röntgenstrahlen oder Chemikalien behandelten Pflanzen.

Bestrahlt wurden emaskulierte Infloreszenzen der Sippe 50, die zuvor am Hauptsproß gekappt wurden, um mehrere Seitensprosse gleichzeitig in Blüte zu haben. Gemäß dem verschiedenen Fokusabstand der einzelnen Blüten schwankte die Dosis von 5000—6900 r (Röntgenapparat von C. H. F. Müller Super M; 8 mA, 169 kV, 1 mm Al-Filter. Dosismessung mit Röntgen-Dosimeter nach Prof. HAMMER). Nach der Bestrahlung wurden die reifen Narben mit Pollen der rezessiven Mutanten bestäubt. Eine Gruppe von 17 Pflanzen wurde nicht emaskuliert und nach der Bestrahlung geselbstet.

Die zu prüfenden Stoffe wurden in wäßriger Lösung auf rasch wachsende Sprosse mittels wiederholter Vakuum-Infiltration appliziert. Zum Zeitpunkt der Behandlung waren noch keine Blütenanlagen vorhanden. Die Blüten der behandelten Sprosse wurden geselbstet. Einzelheiten seien nun für die verschiedenen Versuchsreihen aufgeführt:

Versuch „Try-1“: Trypaflavin in Aqua dest. (100 mg/l) täglich abends infiltriert. Kontrollen mit Aqua dest. infiltriert, die Pflanzen anschließend in die Dunkelkammer gestellt. Behandlungsdauer 9 Tage.

Versuch „Try-3“: Trypaflavinkonzentration 10 mg/l, Behandlungsdauer 7 Tage, sonst wie „Try-1“.

Versuch „IES“: β -Indolylessigsäure 100 mg/l. Früh und mittags wurden die Sprosse in der Lösung gebadet, abends infiltriert, anschließend in die Dunkelkammer gestellt. Behandlungsdauer 14 Tage. Kontrollen mit Aqua dest. gleich behandelt. Schon 2 Tage nach Beginn des Versuches zeigten die mit IES behandelten Sprosse starke Verdrehungen der Blätter, das Sproßwachstum war während der ganzen Behandlungsdauer sistiert, während die Aqua dest.-Kontrollen normal weiterwuchsen. Wenige Tage nach der letzten Infiltration wuchsen die gehemmten Sprosse weiter, die Blüten zeigten keine Fertilitätsstörungen.

Versuch „BP“: 3,4-Benzpyren, gesättigte Lösung in Aqua dest. (Benzpyren + 1000 cm³ Aqua dest. + 300 mg Tween 80, 24 Std im Dunkeln bei 27° C geschüttelt). Die Kontrollen wurden mit Aqua dest. + Tween 80 (300 mg/l) infiltriert. Die Pflanzen wurden auch hier nach der täglichen Behandlung ins Dunkle gestellt. Behandlungsdauer 18 Tage.

Ergebnisse

Die Keimlinge in den F_1 -Aussaaten der behandelten Pflanzen und Kontroll-Geschwister wurden erst dann ausgezählt, wenn das erste Blattpaar nach den

Kotyledonen entfaltet war. Alle Keimlinge mit gescheckten Kotyledonen oder Primärblättern wurden pikiert. Von den in Tabelle 2 aufgeführten 61 albomaculaten Pflanzen konnte keineswegs in allen Fällen durch Kreuzungsexperimente bewiesen werden, daß die beobachtete Buntheit durch ein Gemisch normaler und mutierter Plastiden verursacht war. Denn in den meisten Fällen war es trotz mehrfachen Rückschneidens der Sprosse nicht möglich, Triebe zu erhalten, bei denen sich die Scheckung bis in die Infloreszenz fortsetzte. Wer aber mit albomaculaten Linien einigermaßen vertraut ist, wird ein Scheckungsbild, das durch Plastidenentmischung hervorgerufen wird, von kernbedingten Scheckungen (durch labile Gene oder Zeichnungsgene) unterscheiden können. MICHAELIS (zuletzt 1958) hat dafür auch eine Reihe von Begründungen angeführt. Eine andere Frage ist die, ob nicht durch die Auswertung im Keimlingsstadium „Mutationen“ der Beobachtung entgangen sind. Auch diese Bedenken können zerstreut werden. Aus einer Versuchsgruppe wurden 985 grüne Keimlinge pikiert und aufgezogen. Nach der Blüte des Hauptsprosses wurden die Pflanzen mehrfach gekappt um möglichst viele Seitensprosse von jeder Pflanze auswerten zu können. In keinem einzigen Fall trat noch eine Scheckung auf. In Kreuzungen mit albomaculaten Linien wurden grüne Keimlinge aus Saaten, die mehrere Schecken enthielten, aufgezogen und gekappt. Auch darunter traten, wie in einer anderen Mitteilung zu berichten sein wird, keine bunten Seitensprosse in einer nennenswerten Häufigkeit auf. Die Ergebnisse aller Versuche sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Diskussion

Tabelle 2 zeigt mit genügender Deutlichkeit, daß von einer mutationsauslösenden Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Proplastiden in den Eizellen keine Rede sein kann, und auch die Versuche mit den Chemikalien brachten keine positiven Ergebnisse. Die Röntgenversuche waren so geplant, um den Einfluß des Kernes auf die Mutabilität der Plastiden auf ein Minimum herabzudrücken. Die Häufigkeit der Schecken hätte nur durch dominant wirkende Änderungen im Kern beeinflußt werden können. Bei den Chemikalienversuchen bestand schon eher die Möglichkeit, daß durch Selbstung der behandelten Pflanzen mutationsfördernde, rezessive Gene homozygot wurden. Aber der Vergleich der Häufigkeiten von Schecken bei den Chemikalienversuchen mit den anderen Serien zeigt auch keinen Unterschied. Dem muß noch hinzugefügt werden, daß in den Selbstungsnachkommenschaften der insgesamt 50 mit Trypaflavin, β -Indolylessigsäure oder Benzpyren infiltrierten Pflanzen keine Erhöhung spaltender Mutanten festgestellt werden konnte.

Zu vergleichen sind noch die von MICHAELIS (1958) publizierten Angaben über die mutagene Wirkung des radioaktiven Isotops S^{35} auf die Plastiden von *Epilobium hirsutum*. Die Versuchspflanzen wurden eine Zeitlang in einer isotonen Nährung gezogen und später geselbstet. Die Häufigkeit der Schecken wurde in der ersten Selbstungsgeneration bestimmt. Während nach Behandlung mit P^{32} die Häufigkeit der Schecken genau so hoch wie bei den Kontrollen blieb — und diese produzieren schon auffallend viele Schecken, wie Tabelle 1 zeigt —, wurde ein positiver Effekt mit S^{35} (wenigstens bei der stärksten angewandten Aktivität) erzielt. Die Häufigkeit von Schecken bei den Kontrollen ist 0,25%, bei der

Tabelle 2. Die nach Röntgenbestrahlung (Rö) der Eizellen und Chemikalienbehandlung gefundenen Häufigkeiten albomaculater Keimlinge (nähere Erklärungen zu den einzelnen Versuchen s. Text)

Versuch	albo- macu- late	Gesamtzahl aus- gewerteter Keimlinge	albo- macu- late %	Signifikanz
<i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>gram</i>	2	24260	0,008	$P=0,5-0,7$ } $P=0,1-0,2$
<i>S. 50</i> Kontrolle $\times$ <i>s</i>	0	4938	0	
<i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>s</i>	2	5170	0,039	
<i>S. 50</i> Kontrolle $\times$ <i>s</i>	4	21448	0,019	$P=0,1-0,2$ } $P=0,2-0,3$
<i>dra</i> Kontrolle $\times$ <i>s</i>	1	1594	0,063	
<i>marm</i> Kontrolle $\times$ <i>s</i>	0	4501	0	
<i>niv</i> Kontrolle $\times$ <i>s</i>	4	14956	0,027	
Summe Kontrolle	9	42499	0,021	$P=0,5-0,7$ } $P=0,1-0,2$
<i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>dra</i>	9	72028	0,013	
<i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>marm</i>	10	71950	0,014	
<i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>niv</i>	6	72587	0,008	
Summe <i>S. 50</i> (Rö) $\times$ <i>dra</i> , <i>marm</i> , <i>niv</i>	25	216565	0,012	
„Try-1“ $\times$ <i>s</i>	3	9843	0,035	$P=0,2-0,3$
„Try-1 Kontrolle“ $\times$ <i>s</i>	0	4267	0	
„Try-3“ $\times$ <i>s</i>	12	69228	0,017	$P=0,1-0,2$
„Try-3 Kontrolle“ $\times$ <i>s</i>	0	14139	0	
„IES“ $\times$ <i>s</i>	5	38447	0,013	$P=0,5-0,7$
„IES-Kontrolle“ $\times$ <i>s</i>	0	1943	0	
„BP“ $\times$ <i>s</i>	2	1630	0,123	$P=0,2-0,3$
„BP-Kontrolle“ $\times$ <i>s</i>	1	3001	0,033	
Gesamtmaterial	61	435930	0,014	

betreffenden Versuchsgruppe mit S^{35} 0,77%. Vorausgesetzt, daß Versuchsgruppe und Kontrollen streng vergleichbar sind, kann man den Unterschied als gesichert ansehen. Das heißt aber nicht ohne weiteres, daß die Mutabilität des Plastoms durch die Isotopenbehandlung direkt beeinflußt wurde, denn MICHAELIS (1958) berichtet über eine auffallend hohe Steigerung der Frequenz spaltender Mutationen im Gefolge der Isotopenapplikation. So ist es immerhin denkbar, wenn nicht geradezu wahrscheinlich, daß von den 0,77% Schecken ein Teil durch kern-induzierte Plastidenmutationen entstanden ist. Durch Verwendung grüner Äste der *Epilobium*-Schecken als Väter müßte sich dieser Einwand ausschalten lassen. Man wird damit rechnen müssen, daß die bei Mais, Gerste, *Nepeta* und *Paramaecium* (s. die eingangs zitierte Literatur von RHOADES, ARNASON usw.) beschriebenen Phänomene nur insofern Sonderfälle darstellen, als dort die Genwirkungen auf die plasmatischen Strukturen (womit hier auch die Plastiden eingeschlossen sind) eben so stark sind, daß sie leicht erfaßt werden konnten.

Zytologische Beobachtungen an verschiedenen in Tabelle I enthaltenen Plastidenmutanten sind schon an anderen Orten mitgeteilt worden (MALY und WILD 1956, WILD 1958).

Herzlich danke ich Fräulein I. DOBRIGKEIT und Frau G. LINDNER für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Summary

Experiments to raise the frequency of plastid-mutations in *Antirrhinum majus* have been ineffective when proplastids were X-rayed in egg-cells or were treated in meristems of growing plants by infiltration of three different chemicals.

Literatur

ARNASON, T. J., and G. W. R. WALKER: An irreversible gene induced plastid mutation. *Canad. J. Res. C* **27**, 172 (1949). — BAUR, E.: Untersuchungen über die Vererbung von Chromatophorenmerkmalen bei *Melandrium*, *Antirrhinum* und *Aquilegia*. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **4**, 81 (1910). — CORRENS, C., u. F. v. WETTSTEIN: Nichtmendelnde Vererbung. In *Handbuch der Vererbungswissenschaften* Berlin 1937. — HAUSTEIN, E.: Die Plastidenvererbung bei *Oenothera Berteriana* und *Oenothera odorata*. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **75**, 661 (1938). — KNAPP, E.: Haploide Pflanzen von *Antirrhinum majus*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **57**, 371 (1939). — KNUDSON, L.: Permanent changes of chloroplasts induced by X-rays in the gametophyte of *Polypodium aureum*. *Bot. Gaz.* **101**, 721 (1940). — MALY, R.: Zytomorphologische Studien an strahleninduzierten, konstant abweichenden Plastidenformen bei Farnprothallien. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **83**, 447 (1951). — Die Genetik einiger strahleninduzierter, abweichender Plastidenformen bei Farnen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 469 (1958a). — Eine genetisch bedingte Störung der Zelltrennung bei *Paramacium aurelia* var. 4. Ein Beitrag zum Problem der Mutabilität plasmatischer Systeme. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 397 (1958b). — MALY, R., u. A. WILD: Ein cytologischer Beitrag zur „Entmischungstheorie“ verschiedener Plastidensorten. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 493 (1956). — MICHAELIS, P.: Über Abänderungen des plasmatischen Erbgutes. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **83**, 36 (1949). — Ergebnisse der Versuche an *Epilobium* (Weidenröschen) zur Plasmavererbung. *Biologie in der Schule*, **6**, S. 149. 1957. — Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden. I. Teil. *Planta (Berl.)* **51**, 600 (1958). — RENNER, O.: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. *Flora (Jena)* **130**, 218 (1936). — RHOADES, M. M.: Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **29**, 327 (1943). — SCHERZ, W.: Beiträge zur Genetik der Buntblättrigkeit. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **45**, 1 (1927). — STUBBE, W.: Genetische und cytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens*. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **85**, 180 (1953). — WILD, A.: Experimentelle Beeinflussung des Granamusters einer abweichenden Plastidensorte von *Antirrhinum majus*. *Planta (Berl.)* **50**, 379 (1958). — WOODS, M. W., and H. G. DU BUY: Hereditary and pathogenic nature of mutant mitochondria in *Nepeta*. *J. nat. Cancer Inst* **11**, 1105 (1951).

Dr. ROLAND MALY, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS,
Tübingen/N, Corrensstraße 41

Aus dem Zoologischen Institut, Bonn

DIE ABHÄNGIGKEIT DER KÖRPERFARBE BEI *DROSOPHILA MELANOGASTER* VON EINEM GENBEDINGTEN HEMMSTOFF

Von

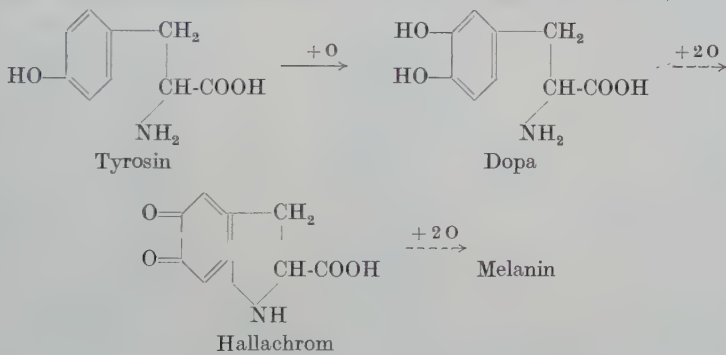
WALTER ENCKE

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1958)

I. Einleitung

Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* unterscheiden sich die Rassen „wild“ (+), „yellow“ (y), „ebony“ (e) und „black“ (b) äußerlich nur in der Körperfärbung. Die Mutanten e und b sind schwarz, y ist gelb und die Wildfliege (+) braun. Das Körperpigment der Fliegen gehört, wie man schon lange weiß, zu den Melaninen und entsteht durch fermentative Oxydation aus dem Chromogen Tyrosin über mehrere Zwischenstufen (RAPER 1927, 1932), von denen hier nur das Dioxyphenylalanin (Dopa) und das Hallachrom („roter“ Stoff) interessieren:



Danach lag natürlich die Vermutung nahe, daß den Farbunterschieden bei den erwähnten Fliegenrassen irgendwelche genbedingten qualitativen und quantitativen Unterschiede im Ferment- oder Chromogengehalt zugrunde lägen. Diese Annahme hat sich jedoch nicht bestätigt (GRAUBARD 1933, WOLSKY 1937—1948, MEDVEDEW 1937, DANNEEL 1943, 1946, OHNISHI 1953/54). Auf Anregung von Herrn Prof. Dr. R. DANNEEL habe ich daher die ganze Frage unter einem anderen Gesichtspunkt noch einmal überprüft.

II. Material und Methode

Als Versuchstiere verwandte ich die braunen, schwarzen und gelben Mutanten wild (+), ebony (e), black (b) und yellow (y) von *Drosophila melanogaster*. Die Tiere wurden bei 25° auf Standard-Futtergemisch wie üblich gezüchtet, und die frisch verpuppten Larven zur genauen Altersbestimmung je nach Bedarf stündlich oder in größeren Zeitabständen abgesammelt und isoliert.

Die Identifizierung des Chromogens und seine quantitative Bestimmung erfolgte papierchromatographisch und zwar nach der aufsteigenden Methode mit dem Papier S.S. 2045b.

Als Lösungsmittel dienten Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4:1:1 oder Propanol-Ammoniak 3:1. Die quantitativen Bestimmungen wurden mit Hilfe eines Multiflexgalvanometers vorgenommen, und die erhaltenen Kurven mit dem Planimeter ausgemessen. Von dem betreffenden Stoff wurde dann eine Eichkurve hergestellt, an Hand deren sich der Gehalt der jeweiligen Flecke annähernd quantitativ bestimmen ließ. In den meisten Fällen wurden keine Extrakte hergestellt, sondern die kurz abgekochten Puppen direkt auf das Chromatogramm aufgequetscht.

Die *Fermente* lassen sich am besten durch Elektrophorese trennen. Als Puffer benutzte ich hierbei ausschließlich den Phosphatpuffer ($pH=7,2$) nach SÖRENSEN, der sich, wie Vorversuche ergeben hatten, für diesen Zweck am besten eignet. Als Papier dienten die Sorten S.S. 2043a, Whatman I und S.S. 2040a. Die ersten Trennungsversuche, wie auch alle quantitativen Bestimmungen wurden in der „horizontalen“ Elektrophoreseapparatur „Elphor“ vorgenommen. Später zeigte sich aber, daß die abfließende, kontinuierlich arbeitende Elektrophoreseapparatur „Elphor“ in manchen Fällen bessere Trennungen ergibt.

Zum Nachweis der Phenolasen dienten Mono- und Diphenole, die ja durch die entsprechenden Phenolasen geschwärzt werden. Auf die Methoden der Extrakterstellung, die nach Bedarf variiert wurden, kann ich erst bei der Besprechung der Fermentversuche eingehen.

III. Chromogenuntersuchungen

Zum Nachweis des Chromogens chromatographierte ich *Drosophila*-Puppen und behandelte die Chromatogramme mit *Drosophila*-Phenolase. Dabei lieferten *e*- und *y*-Puppen eine gleich starke Schwärzung bei dem *Rf*-Wert 0,3. Wie Kontroll-

versuche ergaben, liegt an dieser Stelle Tyrosin, das auch mit diazotierter Sulfanilsäure identifiziert werden konnte.

Zur Durchführung der Versuche wurden die *e*- und *y*-Puppen kurz aufgekocht, getrennt auf Chromatographiepapier aufgequetscht und mit Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert. Nach dem Trocknen wurde das Chromatogramm in einer feuchten Kammer leicht mit Aqua dest. besprüht und

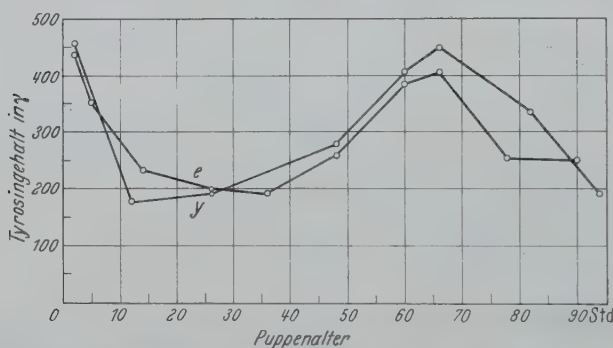


Abb. 1. Die Änderung des Tyrosingehaltes (pro Gramm Körpergewicht) von *e*- und *y*-Tieren im Laufe der Puppenentwicklung

dann von oben nach unten mit einem phenolasehaltigen *Drosophila*-Extrakt bestrichen, der von *y*-Puppen stammte, die erst gewaschen und dann in wenig H_2O zerquetscht worden waren. Die dekantierte, milchigweiße Flüssigkeit besitzt einen hohen Phenolasegehalt.

Der Chromogengehalt ändert sich, wie schon OHNISHI beobachtet hat, im Laufe der Puppenentwicklung. Bei den einschlägigen Versuchen habe ich je 20 Puppen genau bestimmten Alters mit Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert, die Chromatogramme mit diazotierter Sulfanilsäure entwickelt, die jeweilige Tyrosinmenge an Hand der gebildeten Farbflecke bestimmt und auf 1 g Puppengewicht umgerechnet. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit den Befunden von OHNISHI ein Tyrosinmaximum zur Zeit der Puppenbildung. Dazu trat aber noch ein zweites Maximum in der Zeit der Körperpigmentierung (im Puppenalter von 66 Std), das OHNISHI entgangen ist, weil er nur junge Puppen untersuchte. Während der Puppenentwicklung wird also zweimal besonders viel Tyrosin be-

nötigt, nämlich erstes bei der Bildung der Hülle und zweitens zu Beginn der Körperpigmentierung. Beide Maxima liegen bei etwa 0,4—0,5 mg Tyrosin pro Gramm Puppengewicht. (OHNISHI fand 2,6—3,2 mg, also fast die 10fache Menge, doch liegt hier offensichtlich ein Rechenfehler vor.)

Beim Vergleich des Tyrosingehaltes von *e*- und *y*-Puppen ergaben sich, wie gesagt, fast übereinstimmende Werte (Abb. 1). *Die verschiedenen gefärbten Rassen von Drosophila melanogaster unterscheiden sich also nicht in ihrem Chromogengehalt.*

IV. Fermentuntersuchungen

1. Elektrophoretische Trennung der Phenolasen

Da nach DANNEEL und OHNISHI mehrere, nämlich mindestens 2 Fermente, in den Pigmentierungsprozeß eingreifen, lag der Gedanke nahe, diese Fermente mit Hilfe der Elektrophorese voneinander zu trennen.

Hierzu wurden *Drosophila*-Puppen im Alter von 0—24 Std in Kohlensäureschnee gefroren, gemörsert und im Eisschrank bei 0° gegen 0,15 mol Na_2HPO_4 dialysiert. Der Dialyserückstand wurde dann auf Elektrophoresepapier aufgetragen, und dieses in den „Elphor“ (horizontal) eingespannt. Mit einem Gleichstrom von 220 Volt lief der Versuch 8—12 Std. Das noch feuchte Elektrogramm wurde dann auf eine Glasplatte gelegt und mit einer gesättigten Dopalösung besprüht.

Bei diesen Versuchen wurde nach kurzer Zeit unmittelbar unterhalb der Startlinie, also zum negativen Pol hin, eine Schwärzung sichtbar. Etwa 5 min später trat ein zweiter Fleck etwa 3—4 cm von der Auftragstelle zum positiven Pol hin in Erscheinung (Abb. 2). *Der Puppenextrakt enthält also 2 Fermente*, die sich mit Hilfe der Elektrophorese voneinander trennen lassen und beide mit Dopa unter Schwärzung reagieren.

Dasselbe Ergebnis hatten Versuche mit der abfließend und kontinuierlich arbeitenden Elektrophoreseapparatur (220 Volt, 20 mA).

Hierzu verwendete ich keinen Extrakt, sondern trug auf das Elektrophoresepapier, ohne den Strom zu unterbrechen, stündlich neuen Brei von 1—2 frisch verpuppten Larven auf, wobei der alte Puppenbrei vorher jeweils vorsichtig mit einer Pinzette entfernt wurde. So floß ständig ein Strom frischer Substanz das Elektrophoresepapier hinab, das jeweils nach 8—10 Std mit Dopa entwickelt wurde (Abb. 3).

Hier war die Trennung der beiden Phenolasen noch deutlicher als bei der horizontalen Elektrophorese. Während Phenolase I nur sehr schwach zum nega-



Abb. 2. Mit Dopa entwickeltes Elektrogramm eines Puppenextraktes. Unter der Startlinie liegt die Monophenolase, darüber die Diphenolase

Abb. 3. Trennung der beiden Phenolasen durch kontinuierlich arbeitende Elektrophorese. Dopareaktion. Die Monophenolase liegt links, die Diphenolase rechts

tiven Pol hin abgelenkt wurde, wanderte Phenolase II relativ weit zum positiven Pol hin. Beim Entwickeln der Fermente stellte sich ferner heraus, daß Phenolase II erst nach längerer Induktionszeit mit Dopa reagiert.

Sprühversuche mit den Monophenolen Tyrosin, p-Kresol, Sympatol und Phenol, bzw. den Diphenolen Brenzkatechin, Adrenalin und Aludrin ergaben darüber hinaus eindeutig, daß Phenolase I sowohl Mono- als auch Diphenole anfärbt, während Phenolase II nur Diphenole dunkeln läßt (Tabelle 1). *Phenolase I ist somit eine Monophenolase und Phenolase II eine Diphenolase.*

Tabelle 1. Die Wirkung der beiden *Drosophila*-Phenolasen auf verschiedene Mono- und Diphenole

Chromogen		Farbe	
		Phenolase I	Phenolase II
Tyrosin	Monophenole	schwarz	farblos
p-Kresol		braun	farblos
Sympathol		rot	farblos
Phenol		rotbraun	farblos
Dopa	Diphenole	schwarz	schwarz
Brenzkatechin		braun	gelb
Aludrin		rotbraun	rot
Adrenalin		rotbraun	rosa

Beide Fermente werden im übrigen bei 60° rasch zerstört, während bei 50° nach 5 min noch eine schwache Fermentreaktion nachweisbar war. Die Temperaturempfindlichkeit ist also für beide Fermente dieselbe.

2. Trennung der Fermente mit Hilfe der Zentrifuge

Da die melaninbildenden Fermente von *Drosophila* zum Teil strukturgebunden sind (DANNEEL), war anzunehmen, daß sie sich auch durch fraktioniertes Zentrifugieren würden trennen lassen.

Für diese Versuche wurden *Drosophila*-Puppen in Kohlensäureschnee gefroren und im Mörser staubfein zerrieben. Der Extrakt wurde mit etwas Wasser versetzt

Tabelle 2. Die Wirkung von Überstehendem und Zentrifugat auf die Färbung von Tyrosin und Dopa

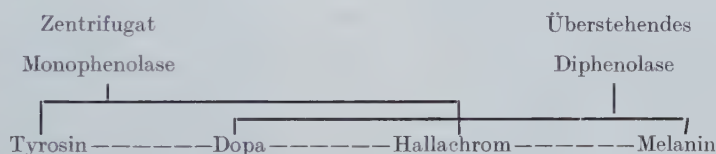
Chromogen	Färbung nach Stunden			
	Überstehendes		Zentrifugat	
	1	20	1	20
Tyrosin	grau	schwarz	rosa	rosa
Dopa	violett	schwarz	rosa	rot

und 48 Std lang bei 0° gegen Wasser dialysiert; der Dialyserückstand wurde erst 30 min lang bei 3500 Umdrehungen, dann 40 min lang bei 6000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Überstehende, wie auch den Rückstand (Zentrifugat), testete ich mit Tyrosin bzw. Dopa und erhielt, wie Tabelle 2 zeigt, verschiedene Resultate. Während nämlich das Überstehende die Chromogenlösung erst grau bzw. violett und dann schwarz färbten, lieferten die Rückstände, wie schon DANNEEL beobachtet hatte, eine Rosafärbung, die dann in eine ziemlich stabile Rotfärbung überging. Tyrosin wurde ferner von dem Überstehenden erst nach einer kurzen Induktionszeit gefärbt, vom Rückstand dagegen sofort.

Wie das daraufhin angesetzte Elektrogramm ergab, erfolgt beim Zentrifugieren eine weitgehende Trennung der Diphenolase (Überstehendes) von der Monophenolase (Rückstand).

Noch vollständiger wird die Trennung in der Ultrazentrifuge. Für diesen Versuch wurden *e*-Puppen im Alter von 0—90 Std in Wasser gewaschen, in Kohlen-

säureschnee gemörsert und gegen 0,15 mol. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (p_H 7,2) 18 Std lang im Eisschrank dialysiert. Nach beendeter Dialyse wurde der Dialyserückstand 20 min lang bei 6000 Umdrehungen, und das noch trübe Überstehende in der Ultrazentrifuge erst 20 min bei 19000 und anschließend weitere 40 min bei 45000 Umdrehungen zentrifugiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen waren alle fermenthaltig, doch zeigte sich im Elektrogramm, daß bei 19000 Umdrehungen ausschließlich die Monophenolase abgeschleudert worden war, bei 45000 Umdrehungen dagegen eine Mischung beider Phenolasen, wobei allerdings der Monophenolasegehalt minimal war. Das nach der Zentrifugierung bei 45000 Touren abdekantierte Überstehende färbte Dopa über Violett zu Schwarz aus, griff Tyrosin dagegen überhaupt nicht an und lieferte im Elektrogramm dementsprechend nur noch die Diphenolase. Nach dem Ergebnis der fraktionierten Ultrazentrifugierung ist also die *Diphenolase* gelöst oder an sehr kleine, schwer abzuschleudernde Partikel gebunden, die *Monophenolase* dagegen an größere Strukturen, vermutlich die Mitochondrien. Die Monophenolase oxydierte nur Monophenole, in diesem Fall Tyrosin, und auch dieses nur bis zu einem roten Derivat (Hallachrom). Die Diphenolase katalysierte zwar die Oxydation der Diphenole bis zum schwarzen Melanin, konnte aber den ersten Schritt vom Tyrosin zum Dopa nicht in Gang setzen:



3. Aktives und inaktives Ferment

Nach OHNISHI soll ein von ihm als „Bluttyrosinase“ bezeichnetes Ferment in frisch verpuppten Larven zwar vorhanden sein, hier aber in einer inaktiven Form vorliegen und erst später durch einen Katalysator aktiviert werden, ein Vorgang, der angeblich durch Salze wie NaCl unterbunden wird. Um diese Angaben zu prüfen, stellte ich nach der Vorschrift von OHNISHI mit H_2O ein aktives und mit 1 mol. NaCl-Lösung ein inaktives Fermentpräparat her. Beide Extrakte wurden dann gleichzeitig elektrographiert. Da beim Entwickeln des Elektrogramms mit Dopa nur aktive Diphenolase geschwärzt wird, mußte ich das etwa vorhandene inaktive Ferment mit Amidoschwarz nachweisen, wobei sich aber natürlich auch das aktive Ferment anfärbte. Wie Abb. 4a deutlich zeigt, kommt die *Diphenolase* tatsächlich in einer aktiven und einer inaktiven Form vor, und zwar hat das inaktive Ferment eine geringere Laufgeschwindigkeit als das aktivierte. Im wäßrigen Extrakt überwiegt die aktivierte Form, doch lassen sich in stark konzentrierten Enzymextrakten auch hier beide Formen nebeneinander nachweisen (Abb. 4b).

Dies Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchungen deckt sich also mit den einschlägigen Befunden OHNISHIS. Im übrigen entspricht nach meinen Befunden OHNISHIS „Bluttyrosinase“ der *Diphenolase* und seine „Cuticulatytrosinase“ der *Monophenolase*.

4. Vergleichende quantitative Fermentbestimmung bei *e*- und *y*-Puppen

Zur quantitativen Bestimmung der Fermente benutzte ich ausschließlich die horizontale Elektrophorese und verwandte dabei jeweils nur eine einzige Puppe. Diese Methode hat zwar den Nachteil, daß die Diphenolase nicht in breiter Front wandert, hat aber den Vorteil, daß das Alter der betreffenden Puppe genau bekannt ist, und daß man immer dieselbe Menge aufträgt, da die Puppengewichte kaum merklich variieren. Der Fermentgehalt wurde wieder mit Hilfe der Dopaschwärzung bestimmt und zwar nach Augenmaß. Die Elektrogramme ergaben, daß der *Phenolasegehalt* kurz vor und während der Verpuppung am größten ist.

+ +



a

b

Abb. 4a u. b. Elektrogramm mit Amidoschwarz entwickelt. a links aktives, rechts inaktives Ferment; b oben aktives, unten inaktives Ferment



a

b

Abb. 5a u. b. Elektrogramm von je einer Puppe von *e*- und *y*-Tieren. Mit Dopa entwickelt. Alter der Puppen in Versuch a 48 Std, in Versuch b 0—2 Std

Schon 48 Std nach der Verpuppung läßt sich dagegen mit Dopa keine Diphenolase mehr nachweisen, während die Monophenolase durch die ganze Puppenzeit hindurch in gleicher Konzentration vorhanden ist (Abb. 5a und b). Ein quantitativer Vergleich von *e*- und *y*-Puppen, der parallel zu diesem Versuch durchgeführt wurde, erbrachte keine Fermentunterschiede zwischen den beiden Rassen. Die verschiedene Körperfärbung der *Drosophila*-Mutanten beruht also weder auf Chromogen- noch auf Fermentunterschieden.

V. Hemmstoffversuche an *Azotobacter croococcum*

1. Vergleichende quantitative Versuche mit +-, *y*-, *e*- und *b*-Puppen

Zur Untersuchung der Puppenextrakte auf etwa vorhandene Hemmstoffe mußte ich mich zunächst nach einem geeigneten biologischen Test umsehen, da für die Verwendung chemischer Nachweismethoden ja keinerlei Anhaltspunkte bestanden. Als brauchbares Testobjekt erwies sich *Azotobacter croococcum*, ein Bacterium, das bekanntlich aus Tyrosin Melanin bildet.

Die Bakterien¹ wurden bei 25° auf folgendem Nährboden in Reinkultur gehalten: 1000 cm³ H₂O, 20 g Dextrin, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ × 7 H₂O, 2 g CaCO₃, 20 g Agar.

In den ersten 4—5 Tagen nach der Beimpfung des Nährbodens wachsen die Kolonien dieses Mikroorganismus sehr stark, bleiben aber zunächst völlig farblos. Erst nach dem 5. Tage tritt an einigen Stellen eine allmähliche, über Gelb und Braun verlaufende Schwärzung auf, die dann in der Regel innerhalb von 24 Std auf die ganze Kolonie übergreift.

Das Verhalten ermöglicht eine recht einfache Versuchsanordnung: Dabei wurden die auf ihren Hemmstoff zu prüfenden Extrakte dem Nährboden zugesetzt, mit ihm zusammen bei 1 Atü und 120° ¹/₄ Std lang autoklaviert und nach dem Erkalten mit *Azotobacter* beimpft.

Verwendet man hierzu gleich konzentrierte Extrakte von *e*- und *y*-Puppen, so färben sich bei richtig gewählter Extraktmenge (s. unten) die mit *e*-Extrakten versetzten *Azotobacter*-Kolonien nach 5 Tagen genauso schwarz an wie die Kontrollkulturen, wohingegen die mit *y*-Extrakt behandelten Kulturen zu dieser Zeit noch völlig farblos sind; eine Ausfärbung tritt hier erst 2—3 Tage später auf. Das Wachstum der Kulturen wird durch die Extraktzusätze in keinem Falle beeinflusst.

Für die Versuche wurden je 0,5 g Puppen im Alter von 0—12 Std nach Zusatz von 3 cm³ Wasser zerquetscht und leicht aufgekocht. Der Körperbrei mit den Hüllen und dem coagulierten Eiweiß wurde abzentrifugiert und das Überstehende als Extraktlösung verwendet. Zu je 1 cm³ Nährboden kamen 0,5 cm³ des zu testenden Extraktes.

Verdoppelt man die Extraktmenge (1 cm³ auf 10 cm³ Nährboden), so verlängert sich die Hemmwirkung im *y*-Test auf mehr als 10 Tage, doch bewirkt jetzt auch der *e*-Extrakt eine geringe Hemmung, die die Pigmentbildung um 1—2 Tage verzögert. Bei weiterer Erhöhung der Extraktkonzentration wird die Hemmwirkung beider Extrakte so groß, daß überhaupt keine Melaninbildung mehr auftritt; die Kulturen werden nur gelb und bilden erst wieder schwarzes Pigment, wenn sie auf normalem Nährboden rückverimpft werden.

Aus diesen Versuchsergebnissen folgt eindeutig, daß sich die Extrakte von *e*- und *y*-Puppen quantitativ in einem Stoff unterscheiden, der die Melaninbildung bei *Azotobacter* hemmt.

Auf diesen Befund hin habe ich nunmehr alle 4 Rassen (junge Puppen von *e*, *y*, + und *b*) gegeneinander ausgetestet. Innerhalb von 6 Tagen färbten sich bei diesem Versuch die mit *e*- und *b*-Extrakt versetzten Kulturen maximal aus, während die Pigmentbildung durch den +-Extrakt leicht verzögert, durch den *y*-Extrakt stark gehemmt wurde (Abb. 6). Die Puppen der hellen *Drosophila*-

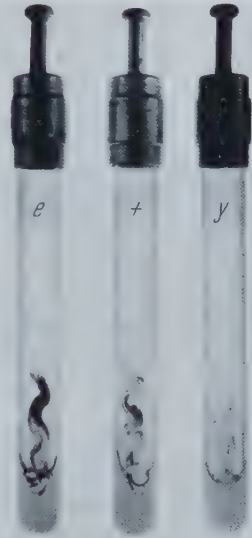


Abb. 6. Die Hemmwirkung von Puppenextrakten (*e*, + und *y*) auf die Melaninbildung bei *Azotobacter*

¹ Die Kulturen verdanke ich Herrn Doz. Dr. STILLE vom Institut für Pflanzenkrankheiten, Bonn.

Rasse *y* enthalten also mehr Hemmstoff als die der *+*-Tiere und diese wieder mehr als die Puppen der dunklen Rassen *e* und *b*.

Der Hemmstoffgehalt nimmt im übrigen mit dem Alter der Puppen zu.

Tabelle 3. Der Hemmstoffgehalt von *e*- und *y*-Tieren verschiedenen Alters, geprüft an *Azotobacter croococcum*

Rasse	Puppenalter	Extraktmenge	Färbung nach		
			5 Tagen	8 Tagen	20 Tagen
<i>e</i>	Larve	0,5 cm ³	schwarz		
<i>y</i>	Larve	0,5 cm ³	schwarz		
<i>e</i>	Larve	1,0 cm ³	schwarz	schwarz	
<i>y</i>	Larve	1,0 cm ³	farblos	schwarz	
<i>e</i>	Puppe 0—12 Std	0,5 cm ³	schwarz	schwarz	
<i>y</i>	Puppe 0—12 Std	0,5 cm ³	farblos	schwarz	
<i>e</i>	Puppe 0—12 Std	1,0 cm ³	farblos	schwarz	schwarz
<i>y</i>	Puppe 0—12 Std	1,0 cm ³	farblos	farblos	braun
<i>e</i>	Puppe 48—72 Std	0,5 cm ³	farblos	schwarz	
<i>y</i>	Puppe 48—72 Std	0,5 cm ³	farblos	farblos	farblos
<i>e</i>	Puppe 48—72 Std	1,0 cm ³	farblos	farblos	farblos
<i>y</i>	Puppe 48—72 Std	1,0 cm ³	farblos	farblos	farblos

Für diese Versuche wurden *e*- und *y*-Tiere verwendet, und zwar Larven des dritten Stadiums und Puppen im Alter von 0—12 und 48—72 Std. Die Extrakte wurden jeweils den Nährböden in 2 Konzentrationen zugesetzt (0,5 cm³ bzw. 1,0 cm³).

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, enthalten die Larven der *y*- und *e*-Tiere wenig oder gar keinen Hemmstoff. Nach der Verpuppung der Maden steigt dann der Hemm-

stoffgehalt an und erreicht bei 48—72 Std alten Puppen seinen höchsten Wert. Der quantitative Unterschied zwischen den *e*- und *y*-Extrakten trat auch bei allen diesen Versuchen deutlich zutage.

2. Versuche zur Identifizierung des Hemmstoffes

Wie schon aus dem Verfahren der Extrakterstellung hervorgeht, verträgt der Hemmstoff das Erhitzen auf 100°, ist also sicher weder ein Ferment noch überhaupt ein Eiweiß. Damit entfällt auch die von mehreren Autoren, so von DENNELL (1949) in anderem Zusammenhang geäußerte Vermutung, bei *Drosophila* sei eine Dehydrase als Gegenspieler zur Phenolase wirksam.

Dialysiert man stark hemmstoffhaltige *y*-Extrakte 24 Std lang im Eisschrank gegen H₂O und testet dann sowohl das *Dialysat* als auch den Rückstand an *Azotobacter*, so bewirkt nur das *Dialysat* eine Hemmung der Melaninbildung. Der Hemmstoff ist somit dialysabel, d. h. niedermolekular. Er ist ferner, wie weitere Versuche mit *Azotobacter* als Testobjekt ergaben, auch in manchen organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, Äthanol und Methanol leicht löslich, nicht aber in Chloroform. Durch Laugen (0,1 n NaOH) wird er zerstört.

Anhand des *Azotobacter*-Tests konnte nun auch die papierchromatographische Untersuchung des Hemmstoffes in Angriff genommen werden.

Dazu wurden *e*- und *y*-Puppen getrennt in Methanol extrahiert und die Extrakte im Wasserbad eingengt, auf das Papier aufgetragen (S.S. 2045b) und mit Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden dann parallel zur Startlinie und zur Lösungsmittelfront in Streifen von je 1 cm Breite zerschnitten, die anschließend mit Methanol eluiert wurden. Die Eluate wurden schließlich vorsichtig bis fast zur Trockne im Wasserbad eingengt und einzeln an *Azotobacter* getestet.

Dabei fand sich ein Hemmstoff bei $RF=0,2-0,25$, der in den *y*-Extrakten reichlich vorhanden war, in den *e*-Extrakten aber fehlte oder in sehr geringer Konzentration vorlag. Die nähere Untersuchung ergab, daß es sich um eine reduzierende Substanz handelte, und zwar um *Ascorbinsäure*.

Als bestes Reagens auf Ascorbinsäure erwies sich ammoniakalische Silberlösung nach FONTANA. Nach dem Besprühen werden die Chromatogramme 24 Std lang im Eisschrank entwickelt, wobei sich etwa vorhandene Ascorbinsäureflecke deutlich rosa färben. Die Ausmessung der Flecke erfolgte mit dem Multiflex-Galvanometer MG 2.

Wie die vergleichenden quantitativen Bestimmungen ergaben, *enthalten y -Puppen pro Gramm Frischgewicht mehr Ascorbinsäure als gleichaltrige e -Puppen, nämlich im Durchschnitt 21γ statt 12γ .*

Chromatographiert man nicht Methanolextrakte, sondern unvorbehandelte zerquetschte Puppen, so erhält man etwas höhere Werte (durchschnittlich 39γ und 29γ); bei der Extraktion geht also Ascorbinsäure verloren.

Diesen Werten als solchen kann man wahrscheinlich kein allzu großes Gewicht beilegen, weil die gefundenen Ascorbinsäuremengen an der Grenze der Nachweisbarkeit liegen. Gesichert ist aber der Unterschied im Ascorbinsäuregehalt von e - und y -Puppen, der in 14 Vergleichs-Chromatogrammen ermittelt wurde und ausnahmslos 20—40% betrug.

Der Ascorbinsäuregehalt nimmt im Laufe der Puppenentwicklung zu, nämlich bei y -Puppen, die ich daraufhin untersucht habe, um rund 20%. Damit bestätigt sich die bereits im Azotobacter-Test gefundene Abhängigkeit der vorhandenen Hemmstoffmenge vom Puppenalter.

Ebenso wie der Hemmstoff des Puppenextraktes verhindert auch reine Ascorbinsäure die Melaninbildung durch *Azotobacter* vollständig, und zwar reichen hierzu weniger als 5 mg Ascorbinsäure auf 10 cm³ Nährboden aus.

Zusammenfassend kann man auf Grund der nunmehr vorliegenden Versuchsergebnisse also mit Sicherheit sagen, daß die verschiedene Körperfärbung der gelben, braunen und schwarzen *Drosophila*-Mutanten weder auf Unterschieden im Chromogen noch auf solchen im Fermentgehalt beruht, sondern darauf, daß *bei hellen Rassen im Laufe der Puppenentwicklung ein Hemmstoff in größerer Konzentration gebildet wird als bei den dunklen Rassen*. Dieser Hemmstoff verzögert die Oxydation des Tyrosins zu Melanin und ist nach den bisherigen Beobachtungen *mit Ascorbinsäure identisch*, die als reversibles Redox-System wahrscheinlich die bei der Oxydation des Tyrosins entstehenden Chinone wieder in Phenole zurückverwandelt.

VI. Diskussion

Die Analyse genbedingter Merkmalsbildungen hat bekanntlich bisher in allen untersuchten Fällen zur Auffindung genabhängiger Fermente geführt, deren chemische Konstitution sich mit den heute verfügbaren Methoden nicht ermitteln läßt, und die man daher auch noch nicht in eine sinnvolle Verbindung zu den entsprechenden Genen bringen kann. Die Entdeckung eines chemisch einfach gebauten genabhängigen Stoffes, wie es die Ascorbinsäure ist, wäre also ein Fortschritt, wenn nachgewiesen werden könnte, daß die Bildung dieses Stoffes nicht etwa ihrerseits wieder von einem genabhängigen Ferment gesteuert würde. Im Falle der Ascorbinsäure liegt dieser Verdacht sehr nahe, weil man längst weiß, daß die Ascorbinsäure im Organismus durch eine Ascorbinsäureoxydase dehydriert wird, wonach also auch hier wieder ein Ferment als zeitlich erstes faßbares Produkt der Genwirkung aufträte.

Dafür, daß es sich so verhält, spricht jedenfalls der Befund, daß der Ascorbinsäuregehalt durch Mutationen ganz verschiedener Gene beeinflußt, nämlich durch e und b erniedrigt, durch y dagegen erhöht wird, wenn man die Wildrasse als Norm nimmt.

Zusammenfassung

1. Tyrosin ist nachweislich die Vorstufe des Melanins bei *Drosophila*. Die Tyrosinkurve weist im Verlauf der Puppenentwicklung 2 Maxima auf, eins zur Zeit der Puppenbildung und ein zweites zur Zeit der Körperpigmentierung. Ein quantitativer Unterschied im Tyrosingehalt von *e*- und *y*-Puppen besteht nicht. Die beiden Rassen unterscheiden sich also nicht hinsichtlich des Chromogens.

2. Durch Elektrophorese lassen sich in den Fliegenpuppen 2 Phenolasen nachweisen und voneinander trennen, nämlich eine Mono- und eine Diphenolase, die auch mittels der Ultrazentrifuge entmischt werden können, weil die Monophenolase strukturell gebunden ist.

Die Monophenolase ist durch die ganze Puppenentwicklung hindurch in gleicher Menge vorhanden, während die Diphenolase nur zur Zeit der Verpuppung in nachweisbarer Menge auftritt.

Quantitative Messungen des Mono- und Diphenolasengehaltes von *e*- und *y*-Puppen ergaben keinen Unterschied. Die beiden Rassen unterscheiden sich also auch nicht hinsichtlich der melaninbildenden Fermente.

3. Die verschiedene Körperpigmentierung der *Drosophila*-Mutanten *e*, *b*, + und *y* beruht vielmehr auf einem Hemmstoff, der die Melaninbildung bei *Azotobacter* hemmt und so quantitativ bestimmt werden kann.

Der Hemmstoff, dessen Menge vom Puppenalter abhängt, nimmt mit abnehmender Körperpigmentierung der Fliegen zu, ist also bei *y*-Tieren am größten, bei *e*- und *b*-Tieren am kleinsten. Er ist dialysabel, thermostabil und in Methanol, Äthanol, Aceton und Wasser löslich; durch Basen wird er zerstört.

Mit Hilfe der Papierchromatographie konnte der genabhängige Hemmstoff als *Ascorbinsäure* identifiziert werden.

Literatur

- COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN: Methods in enzymology. New York Academy 1955. — DANNEEL, R.: Melaninbildende Fermente bei *Drosophila melanogaster*. I. Biol. Zbl. **63**, 377 (1943). — Melaninbildende Fermente bei *Drosophila melanogaster*. II. Biol. Zbl. **65**, 115 (1946). — DENNELL, R.: Weismann's Ring and the control of tyrosinase activity in the larva of *Calliphora erythrocephala*. Proc. roy. Soc. B **136**, 94 (1949). — GRAUBARD, M. A.: Tyrosinase in the mutants of *Drosophila*. J. Genet. **27**, 199 (1933). — HINSBERG, K., u. K. LANG: Medizinische Chemie. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1938. — HOFFMANN-OSTENHOFF: Enzymologie. Wien: Springer 1954. — KARLSON, B., u. H. SCHMID: Über die Tyrosinase der *Calliphora*-Larve. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **300**, 35 (1955). — MEDVEDEV, N. N.: Body colour mutants in *Drosophila* as studied by transplantation. C. R. Acad. Sci. URSS., N.S. **14**, 45 (1937). — OHNISHI, E.: Tyrosinase activity during puparium formation in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Zool. **11**, 69 (1953). — Tyrosinase in *Drosophila virilis*. Annot. Zool. Japon. **27**, 33 (1954). — Activation of tyrosinase in *Drosophila virilis*. Annot. Zool. Japon. **27**, 189 (1954). — Melanin formation in the mutant "Ebony" of *Drosophila melanogaster*. Annot. Zool. Japon. **27**, 76 (1954). — RAPER, H. S.: The tyrosinase-tyrosin reaction VI. Biochem. J. **21**, 89 (1927). — Tyrosinase-Ergebnisse der Enzymforschung I. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1932. — WOLSKY, A.: Production of local depressions in the development of *Drosophila* pupa. Nature (Lond.) **139**, 1069 (1937). — Quantitative differences between the dehydrogenase enzym systems of wild type and "Ebony" pupae of *Drosophila melanogaster*. Mag. Biol. Kut. Munk (Tihany) **14**, 465 (1942). — Further investigations on the mechanism, determining body colour in *Drosophila melanogaster*. Hung. Acta Biol. **1**, Nr 1 (1948).

Dr. WALTER ENCKE, Zoologisches Institut der Universität, Bonn
Poppelsdorfer Schloß

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln

ÜBER DAS VERHALTEN MUTANTER SCHUPPEN AUF DEN HINTERFLÜGELN DER MEHLMOTTE *EPHESTIA KÜHNIELLA* NACH PUPPENBESTRAHLUNGEN

Von

HEINZ-JOACHIM POHLEY und HANS ESSER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 7. August 1958)

Einleitung

Bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* treten nach Behandlung der Raupen oder jungen Puppen mit hartem Röntgenlicht auf den beschuppten Falterflügeln veränderte Schuppen auf, die auf Grund ihres Verhaltens als Schuppenmutanten angesehen werden können (HENKE und POHLEY 1952, POHLEY 1953). Sie sind vereinzelt oder zu mehreren in Nestern angeordnet und gehören verschiedenen Mutantensorten an. Diese unterscheiden sich durch ihr Aussehen und durch die Häufigkeit, mit der sie auf den Flügeln erscheinen. Ein Teil der verschiedenen Mutanten tritt bei Weibchen und Männchen etwa gleich häufig auf, der andere Teil fast nur auf den Flügeln der Weibchen, die bei den Schmetterlingen heterogametisch sind. Eine Tafel der verschiedenen Mutantensorten ist in der Arbeit von POHLEY (1955) abgebildet.

Das Auftreten mutanter Schuppen setzt somatische Mutationen voraus, die als Folge der Durchstrahlung in den schuppenbildenden Zellen der Flügelanlage oder deren Vorfahren entstehen. Gehen mehrere Schuppenzellen durch Teilungen aus einer mutierten Zelle hervor, so bildet sich ein Nest. Die Größe der Mutantennester verändert sich auch dementsprechend mit dem Behandlungsalter der Raupen.

Die Möglichkeit, durch somatisch ausgelöste Mutationen Zellen zu markieren, kann man benutzen, um die Wachstumsordnung der Flügelanlagen zu untersuchen. Daneben können aber auch Auskünfte über den Mutationsvorgang selbst eingeholt werden. Praktisch sind beide Aspekte miteinander verknüpft (vgl. hierzu BECKER 1957).

Über das Verhalten der Schuppenmutanten nach Raupendurchstrahlungen ist bereits berichtet worden (POHLEY 1955). Die vorliegende Arbeit enthält hauptsächlich Angaben über das Ergebnis von Puppenbestrahlungen. Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

1. Bis zu welchem Bestrahlungsalter treten noch Mutantennester auf?
2. Bis zu welchem Bestrahlungsalter erscheinen noch Einzelmutanten und wie ist ihre Verteilung auf der Flügelfläche?
3. Gibt es in diesen Punkten Unterschiede zwischen den Mutantensorten?

Aufzucht, Behandlung und Auswertung

Um die gestellten Fragen beantworten zu können, wurden normale Mehlmottenraupen, die in Massenzuchten nach der von KÜHN und HENKE (1929) beschriebenen Weise bei 25° C

aufgezogen worden waren, kurz vor ihrem Eintritt in die Vorpuppenphase in großflächige, mit ein wenig Futter und feuchtem Filtrierpapier bestückte Petrischalen gelegt, 0—12 Std nach der Verpuppung abgesammelt und bis zum Bestrahlungstermin nach Altersklassen gesondert in 25° C aufbewahrt. Die Behandlung selbst erfolgte in einem flachen Cellophanbeutel. Bestrahlt wurde mit hartem Röntgenlicht (Röhrenspannung 100 kV, Filter 1,7 mm Al) bis zu einer Dosis von 1000 r. Die in Luft gemessene Dosisleistung betrug 197 r/min. Nach der Behandlung wurden die Puppen weitergezogen, nach dem Schlüpfen der Falter die Flügel abgeschnitten und mit Caedax auf Objektträger aufgeklebt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. Ausgewertet wurden die Hinterflügeloberseiten weiblicher Tiere vorwärts der Ader α .

Ergebnisse und Deutung

Tabelle 1 gibt die Größe und Anzahl der gefundenen Mutantennester und die Anzahl der Einzelmutanten getrennt nach Mutantensorte und Bestrahlungsalter an. Von einer Ausnahme abgesehen treten die letzten Nester in der Altersklasse 12—24 Std auf. Noch bis zu diesem Puppenalter wird also die Anzahl der Schuppenzellen durch Teilungen vermehrt.

Tabelle 1. Die Anzahlen der auf jeweils 100 Hinterflügeloberseiten vorwärts der Ader α nach Durchstrahlung verschieden alter Puppen mit hartem Röntgenlicht gefundenen Einzelmutanten (N1) und Mutantennester der Größe 2 (N2) bis 4 (N4)

Das durchsuchte Feld der Hinterflügeloberseite enthält ungefähr 7000 Schuppen.
ES 1—ES 3 Mutantensorten

Stunden	ES 1				ES 2				ES 3			
	N 1	N 2	N 3	N 4	N 1	N 2	N 3	N 4	N 1	N 2	N 3	N 4
0—12	787	8	1	0	123	4	0	0	40	2	0	0
12—24	733	4	0	1	77	0	0	0	40	0	0	0
24—36	700	1	0	0	71	0	0	0	40	0	0	0
36—48	557	0	0	0	65	0	0	0	38	0	0	0
48—60	50	0	0	0	6	0	0	0	4	0	0	0
60—72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Diese Tatsache ist für unsere Vorstellungen von der Entstehung des Schuppenmusters von Bedeutung. Bisher ist bekannt, daß die einzelnen Schuppenapparate, die in unregelmäßigen Querreihen auf der Flügelfläche angeordnet sind, von jeweils zwei Zellen aufgebaut werden, einer Schuppen- und einer Balgbildungszelle, zu denen als dritter Teil noch eine im Puppenstadium degenerierende Sinneszelle hinzutritt. Diese drei Zellen entstehen durch zwei determinative Zellteilungen aus einer Schuppenstammzelle I. Ordnung, die am Anfang des Puppenstadiums zwischen den Epithelzellen auftaucht. Die erste Teilung, die Mitose I, bringt die degenerierende Zelle und eine Schuppenstammzelle II. Ordnung hervor, die dann durch die Mitose II in die Schuppen- und Balgbildungszelle zerlegt wird (KÖHLER 1932, STOSSBERG 1937, 1938, RÖNSCH 1954).

Nach einer Vorstellung von HENKE (1946) gehen diesen beiden determinativen Zellteilungen weitere voraus. Alle Zellen der Flügelanlage sollen in gleicher Weise zu Schuppenepithelstammzellen ausgezeichnet und dann in je eine Schuppenstammzelle I und eine Epithelstammzelle aufgeteilt werden. Letztere bildet durch Teilungen einen Epithelverband. Da auf dem Vorder- und Hinterflügel durchweg zwei verschiedene Schuppentypen auftreten, die innerhalb der ein-

zeln Schuppenreihen paarweise angeordnet sind, ist mit zwei verschiedenen Sorten von Schuppenepithelstammzellen zu rechnen. Diese sollen ebenfalls aus einer determinativen Zellteilung hervorgehen (HENKE 1947, HENKE und POHLEY 1952, POHLEY 1953).

Gegen diese Vorstellung sind in letzter Zeit Bedenken erhoben worden. Ein Argument geht von der Beobachtung aus, daß durch den Faktor *kfl* (kurzflügelig) die Zellenanzahl des späten Vorpuppenflügels infolge verminderter Zellteilungstätigkeit während der Vorpuppenphase herabgesetzt wird, ohne dabei die Gliederung der Beschuppung und die Anordnung der Schuppen zu verändern. Nur die Anzahl der Schuppen und die Größe der von Epithelzellen aufgebauten Flügelfläche wird verringert (SENGÜN 1940, HAARDT 1943, QUERNER 1948). HENKE (1947) und QUERNER (1948) zogen hieraus den Schluß, daß die postulierten determinativen Zellteilungen entweder erst im Puppenstadium stattfinden oder sich noch während der Vorpuppenmitosenperiode an die durch die Mutation *kfl* direkt beeinflussbaren einfachen Vermehrungsteilungen anschließen. Nun ist aber bereits zu Beginn der Vorpuppenphase die Zellenanzahl der Flügelspreite größer als die Anzahl der Schuppen auf dem Falterflügel (POHLEY 1956). Die Masse der geforderten determinativen Zellteilungen muß also entweder noch vor der Vorpuppenphase ablaufen, was im Widerspruch zu dem Schluß von HENKE und QUERNER steht, oder das Schuppenmuster mit seinen beiden Stammzellsorten entsteht auf andere Weise, denn nach Beginn der Vorpuppenphase ist für die geforderten Zellteilungen kein Platz mehr.

Ein weiteres Argument ergibt sich daraus, daß die beiden paarweise einander benachbarten Schuppentypen durch eine Zellteilung entstehen sollen. Die Mutantennester mit zwei Schuppen müßten demnach aus diesen beiden Schuppentypen bestehen, einer größeren, bevorzugt proximal angeordneten *p*-Schuppe und einer kleineren, bevorzugt distal stehenden *d*-Schuppe, und die größeren Nester müßten Schuppenanzahlen aufweisen, die stets Vielfache von 2 darstellen. Gefunden aber wurden alle Zwischenwerte und die Zusammensetzung aus je einer *p*- und einer *d*-Schuppe tritt nicht allein auf.

In einer neuerdings von POHLEY durchgeführten Untersuchung wurden 264 Zweiernester der Hinterflügeloberseite analysiert. Von diesen konnten 37 keiner bestimmten Gruppe zugeteilt werden. Von den restlichen 227 enthielten 173 je eine *p*- und eine *d*-Schuppe, 40 je zwei *d*-Schuppen und 14 je 2 *p*-Schuppen (Tabelle 2). Doch auch das bevorzugte Erscheinen der erwarteten Zusammensetzung spricht noch nicht zugunsten der Hypothese. Denn untersucht man, wie sich die beiden Schuppen eines Zweiernestes in das normale Schuppenmuster einordnen, so lassen sich die drei Klassen noch weiter aufteilen. Die beiden Mutanten können nämlich derselben Schuppenreihe oder zwei verschiedenen Reihen angehören und im letzteren Falle die *p*-Schuppe der proximal oder der distal gelegenen Querreihe. Die Häufigkeiten, mit denen die verschiedenen Anordnungen auftreten, können zumindest qualitativ erklärt werden, wenn man annimmt, daß die Zellteilungen bevorzugt proximodistal orientiert sind und die Auszeichnung zu Schuppenstammzellen unabhängig von der Teilungszugehörigkeit der Zellen erfolgt. Die Stellung der verschiedenen Schuppen zueinander und ihre Abstände voneinander erweisen sich dann als die entscheidenden Größen. Zum Beispiel ist der mittlere Abstand zwischen einer *p*-Schuppe und

der benachbart stehenden *d*-Schuppe derselben Querreihe am kleinsten, größer ist der mittlere Abstand zwischen einer *p*-Schuppe und einer *d*-Schuppe der proximal gelegenen Querreihe und noch größer der Abstand zwischen einer *p*-Schuppe und einer *d*-Schuppe der distalen Reihe. Die bevorzugt proximodistale Orientierung der Mitosen konnte durch Messungen von POHLEY (im Druck) nachgewiesen werden.

Tabelle 2. *Typus und Anordnung der Schuppen in Zweiernestern*

Durchstrahlt wurden Raupen am 6.—10. Tage des letzten Raupenstadiums, untersucht die Hinterflügeloberseiten vorwärts der Ader *z*. Die dunklen Kreisflächen stellen *p*-Schuppen, die hellen *d*-Schuppen dar. Gehören die beiden Schuppen eines Nestes derselben Schuppenreihe an, so liegen die beiden Kreisscheiben nebeneinander, gehören sie verschiedenen

Reihen an, hintereinander. Unter *xx* stehen die unbestimmten Fälle

Tag								<i>xx</i>	Summe
6.—7.	59	21	19	20	7	9	2	26	163
8.—10.	55	13	6	11	2	1	2	11	101
Summe	114	34	25	31	9	10	4	37	264
Summe	173			40		14		37	264

Die angeführten Sachverhalte sind also mit der Hypothese von der Herausbildung des Schuppenmusters durch determinative Zellteilungen nicht vereinbar. Sie führen zu der Auffassung, daß das Schuppenmuster auf andere Weise entsteht und auch die kleinen Mutantennester aus einfachen Vermehrungsteilungen hervorgehen.

Noch nicht sicher zu beantworten ist, mit welcher Zelle der Stammbaum der Schuppenzellen beginnt. Nach unveröffentlichten Untersuchungsergebnissen von LIPP (schriftliche Mitteilung) laufen unmittelbar nach der Puppenhäutung im Flügelepithel proximodistal gerichtete Mitosen ab, aus denen Zellen hervorgehen, die LIPP in Anlehnung an ihre Befunde bei *Pieris brassicae* (1957) als Schuppenstammzellen I und Epithelzelle deutet. Da jedoch der junge Puppenflügel bereits rund 3mal mehr Zellen enthält als Stammzellen ausgebildet werden, haben diese Schuppenepithelstammzellen nicht die Bedeutung, die ihnen HENKE (1946) zugesprochen hat.

Die Teilungen der Schuppenepithelstammzellen erfolgen nach LIPP auf 5—10 Std alten Puppenflügeln und zwischen 12 und 15 Std erscheinen die ersten Schuppenstammzellen I. ESSER konnte auf 0—6 Std alten Puppenflügeln (8 untersuchte Hinterflügel) keine Mitosen finden. Zwischen 6—12 Std traten vereinzelt Mitosen auf, und zwar bevorzugt im Bereich der Lakunen. In den Zwischenlakunengebieten der 12 untersuchten Hinterflügel lagen im ganzen nur 19 Mitosen. In Einklang mit diesen Beobachtungen ergaben Zellzählungen im Cubitusfeld auch keine wesentlichen Veränderungen der Zellanzahl. Erst ab 12 Std stieg die Mitosen- und Zellenanzahl verstärkt an. Beide Untersucher stimmen darin überein, daß um 15 Std die ersten Schuppenstammzellen I auftauchen, zu einer Zeit also, zu der die letzten Vermehrungsteilungen in den Puppenflügeln ablaufen oder gerade abgeschlossen sind.

Die zweite Frage beantwortet sich aus Tabelle 3. Sie gibt die Anzahl der gefundenen ES1-Mutanten getrennt nach Flügelbereich und Altersklasse, sowie

die Summe der Mutanten je Klasse an. Letztere nimmt in den ersten drei Altersklassen nur wenig, dann aber steil ab und ab 60 Std fehlen Mutanten. Auf dem Hinterflügel erscheinen also Einzelmутanten bis zu einem Bestrahlungsalter von 60 Std. Der Hauptabfall beginnt ab 36 Std.

Es besteht nun die Aufgabe zu ermitteln, mit welchem Zelltyp aus der Genealogie der Schuppenzellen die Möglichkeit schwindet, durch Behandlung mit Röntgenlicht mutante Schuppen zu erzeugen. Dieser Zelltyp muß auf der Oberseite des Hinterflügels zwischen 36 und 60 Std verschwinden. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen sind auf 48 Std alten Puppenhinterflügeln alle Schuppenstammzellen sichtbar und degenerierende Zellen, also auch Schuppenstammzellen II. Ordnung vorhanden. Über 60 Std treten kaum noch Mitosen auf und bei 72 Std alten Puppen zeigen sich auf der Flügelfläche die auswachsenden Schuppenfortsätze. An Hand dieser vorläufigen Daten ist der gesuchte Zelltyp zwar noch nicht mit Sicherheit anzugeben, doch genügen wahrscheinlich die Schuppenstammzellen II den gestellten Anforderungen.

Das Auffinden des gesuchten Zelltyps dürfte durch einen Befund erleichtert werden, der sich bei einem Vergleich der Mutantenhäufigkeiten in den verschiedenen Flügelbereichen ergibt (Tabelle 3). Diese fallen in den hinteren Flügelbereichen früher ab und erreichen bereits zwischen 48 und 60 Std den Nullpunkt.

Tabelle 3. Verteilung der *ES1*-Mutanten auf die einzelnen Flügelbereiche der Hinterflügeloberseite (vgl. Tabelle 1).

Vk Vorderkante, *r* Radius, *m* Media, *cu* Cubitus, *an* Analis, α Axillaris. Die Intercostalfelder zwischen *cu*₂ und *an* sowie *an* und α sind in einen vorderen und hinteren Bereich unterteilt. Das Adermuster zeigt Abb. 1

Stunden	<i>Vk</i>	<i>r</i> ₂	<i>m</i> ₁	<i>m</i> ₂	<i>cu</i> ₁	<i>cu</i> ₂	<i>an</i>		α	Summe
0—12	83	100	112	120	89	105	94	56	47	806
12—24	78	100	109	91	102	89	80	48	48	745
24—36	75	100	99	87	85	92	79	45	40	702
36—48	62	100	96	94	71	65	35	20	14	557
48—60	9	13	13	9	4	2	0	0	0	50
60—72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

In Abb. 1* ist dieser Befund bildlich dargestellt. Während sich auf dem Flügel (0—12 Std) die Mutantenorte ziemlich gleichmäßig verteilen, beschränken sie sich beim Flügel b (48—60 Std) auf den vorderen Bereich. Zwischen 48 und 60 Std muß also der gesuchte Zelltyp nur noch in diesem Bereich aufzufinden sein.

Sollte es sich bestätigen, daß die determinativen Zellteilungen über den Hinterflügel hinweglaufen, so hätte man es mit einem ähnlichen Phänomen zu tun, wie es BRAUN (1938) für den Vorderflügel beschrieben hat. Über diesen laufen von proximal nach distal zwei Mitosenwellen hin. Die erste Welle umfaßt die Mitose I und die gewöhnlichen Epithelzellteilungen, die zweite Welle, die sich unmittelbar anschließt, besteht aus den determinativen Zellteilungen der Schuppenstammzelle II.

* Frau HILDEGARD FRAMENAU danken wir für die Anfertigung der Zeichnungen.

Aus der Erkenntnis, daß nach Ablauf der letzten determinativen Zellteilung durch Strahlenbehandlung keine Mutanten mehr erzeugt werden können, die Zellteilung also als notwendiger Faktor für das Durchsetzen einer somatisch ausgelösten Mutation in Erscheinung tritt, ist in bezug auf Frage 3 nur noch zu erwarten, daß die Mutantenhäufigkeit der verschiedenen Mutantensorten in



Abb. 1 a u. b. Anordnung der Schuppenmutanten vom Typ *ES1* auf der Hinterflügeloberseite vorwärts der Ader α nach Durchstrahlung 0—12 (a) und 48—60 (b) Std alter Puppen mit Röntgenlicht. Nach Mutanten durchsucht wurden für a 100, für b 200 Oberseiten weiblicher Imagines

annähernd gleicher Weise mit dem Bestrahlungsalter der Puppen abnehmen. Wie die Tabelle 1 zeigt, ist dies auch für die drei untersuchten Mutantensorten der Fall.

Zusammenfassung

Nach Durchstrahlung verschieden alter Puppen (Zuchttemperatur 25° C) mit hartem Röntgenlicht wurden die beschuppten Hinterflügel der Mehlmotte *Ephestia kühniella* nach mutanten Schuppen durchsucht, deren Häufigkeiten in den verschiedenen Flügelbereichen festgestellt und das Auftreten von Mutantennestern vermerkt. Darüber hinaus wurde an Hand bereits vorliegenden Materials der Aufbau kleinerer Mutantennester untersucht.

Die aus zwei Schuppen bestehenden Zweiernester, die nach Durchstrahlung 6—10 Tage alter Tiere des letzten Raupenstadiums auf den Hinterflügeloberseiten gefunden wurden, sind entweder aus je einer *p*- und einer *d*-Schuppe, oder aber aus zwei *p*-Schuppen bzw. zwei *d*-Schuppen zusammengesetzt. Die Schuppen können derselben Reihe oder zwei verschiedenen Schuppenreihen angehören. Die Häufigkeiten, mit denen die verschiedenen Anordnungen auftreten, zeigen, daß die Herausbildung der beiden Schuppentypen, die auf der Flügelfläche paarweise angeordnet sind, unabhängig von einer Zellteilung erfolgt. Alle Zellteilungen der Flügelanlage, die zu Mutantennestern führen, sind demnach reine Vermehrungsteilungen.

Nach Durchstrahlung 0—12 und 12—24 Std alter Puppen wurden auf je 100 Flügelseiten noch mehrere Mutantennester mit 2 bis 4 Schuppen gefunden. Von einer Ausnahme abgesehen erscheinen nach Behandlung älterer Puppen keine Nester mehr. Die letzten Vermehrungsteilungen der Hinterflügelanlagen fallen demnach zeitlich eng mit dem Auftauchen der ersten Schuppenstammzellen I. Ordnung zusammen, die um 15 Std nach der Puppenhäutung erscheinen.

Die Häufigkeit der einzelnstehenden Schuppenmutanten sinkt in den Bestrahlungsklassen 36—48 und 48—60 Std steil ab. Flügel der letzteren Klasse tragen Mutanten nur noch im vorderen Bereich. Über 60 Std alte Puppenflügel bringen nach Bestrahlung keine Mutanten mehr hervor. Das Absinken der Mutantenhäufigkeit beruht wahrscheinlich darauf, daß eine Mutation, die nach der Teilung der Schuppenstammzellen II. Ordnung in je eine Schuppen- und Balgbildungszelle mittels Durchstrahlung gesetzt wird, nicht mehr wirksam werden kann.

Die Mutantenhäufigkeit der drei untersuchten Mutantensorten sinken in annähernd gleicher Weise mit dem Bestrahlungsalter der Puppen ab.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.

Literatur

- BECKER, H. J.: Über Röntgenmosaikflecken und Defektmutationen am Auge von *Drosophila* und die Entwicklungsphysiologie des Auges. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 88, 333—373 (1957). — BRAUN, W.: Über das Zellteilungsmuster im Puppenflügel der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. in seiner Bedeutung zur Ausbildung des Zeichnungsmusters. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 135, 494—520 (1936). — HAARDT, K.: Über die Ausprägungsweise und Ausprägungsbedingungen der Mutation *kfl* (kurzflügelig) bei *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. 63, 478—487 (1943). — HENKE, K.: Über die verschiedenen Zellteilungsvorgänge in der Entwicklung des beschuppten Flügelepithels der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. 65, 120—135 (1946). — Einfache Grundvorgänge in der tierischen Entwicklung I. Naturwiss. 34, 1—15 (1947). — HENKE, K., u. H.-J. POHLEY: Differentielle Zellteilungen und Polyploidie bei der Schuppenbildung der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Z. Naturforsch. 7b, 65—79 (1952). — KÖHLER, W.: Die Entwicklung der Flügel bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER, mit besonderer Berücksichtigung des Zeichnungsmusters. Z. Morph. u. Ökol. Tiere 24, 582—681 (1932). — KÜHN, A., u. K. HENKE: Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, math.-physik. Kl., N. F. 15, H. 1 (1929). — LIPP, CH.: Die Bedeutung differentieller Zellteilungen bei der Entstehung des Schuppenmusters auf dem Flügel von *Pieris brassicae*. Biol. Zbl. 76, 681—700 (1957). — POHLEY, H.-J.: Untersuchungen über differentielle Zellteilungen und somatische Mutationen am Schuppenkleid der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. 72, 577—598 (1953). — Über die somatische Mutabilität bei

Ephestia kühniella. Biol. Zbl. **74**, 474—480 (1955). — Untersuchungen über das Zellteilungswachstum der Flügelanlagen von *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. **75**, 86—98 (1956). — QUERNER, H.: Untersuchungen über die Flügelform der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z., insbesondere der Faktor *kfl* (kurzflügelig). Biol. Zbl. **67**, 293—319 (1948). — RÖNSCH, G.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen zur Zelldifferenzierung am Flügel der Trichoptere *Limmophilus flavicornis* FABR. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **43**, 1—62 (1954). — SENGÜN, A.: Eine neue Mutation „kurzflügelig“ (*kfl*) bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. **60**, 23—34 (1940). — STROSSBERG, M.: Über die Entwicklung der Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. **57**, 393—402 (1937). — Die Zellvorgänge bei der Entwicklung der Flügelschuppen von *Ephestia kühniella* Z. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **34**, 173—206 (1938).

Dr. HEINZ-JOACHIM POHLEY,
Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GONENKONKURRENZ
IN DER SAMENANLAGE BEI *OENOTHERA* UNTER VERWENDUNG
DER LETALFAKTOREN ALS MARKIERUNGSGENE

III. Mitteilung

DIE GENETISCHE KOMPONENTE DER VARIABILITÄT

Von

CORNELIA HARTE

(Eingegangen am 7. August 1958)

A. Einleitung

Wie in der Einleitung zum 1. Teil dieser Untersuchungen (HARTE 1954, 1958a) dargelegt wurde, ist die Aufgabe gestellt, die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage von *Oenothera* näher zu untersuchen, um durch eine Analyse ihrer Variabilität zu Aussagen über die Faktoren zu gelangen, von denen dieser Vorgang beeinflusst wird. Es zeigte sich, daß in einer Komplexkombination die Konkurrenz um die Bildung des Embryosackes zwischen den genetisch verschiedenen Gonen, die aus einer Makrosporenmutterzelle durch die Meiosis hervorgehen, erhebliche Variationen aufweisen kann, sowohl zwischen den Blüten einer Pflanze, wie zwischen verschiedenen Pflanzen. Die äußeren Bedingungen wirken dabei vor allem auf die Stabilitätslage der Pflanzen ein, so daß unter extremen Umwelteinflüssen die Variabilität vergrößert wird, ohne daß die Faktoren, die für den Vorgang der Konkurrenz direkt verantwortlich sind, damit erfaßt werden konnten (HARTE 1958b).

Alle durchgeführten Vergleiche wurden zwar an verschiedenen Sorten geprüft, ohne daß aber die Sortendifferenzen als solche in die Betrachtung einbezogen wurden. Als letztes ist es daher nötig, die Unterschiede zwischen den einzelnen Komplexkombinationen zu untersuchen, um Aussagen über den Einfluß genetischer Faktoren machen zu können. Es geht also um die Beantwortung der a. a. O. aufgeworfenen Frage, ob ein bestimmter Komplex eine bestimmte Konkurrenzfähigkeit besitzt, die unabhängig von seinem Partner ist, und ob die genetische Konstitution des Pollen- oder des Eizellenkomplexes hierbei entscheidend ist, oder ob vielmehr das durchschnittliche Ausmaß der Konkurrenz und ihre Variabilität von den Eigenschaften beider Partner her bestimmt wird.

Die Gesamtanalyse erstreckt sich auf mehrere Punkte: Zuerst wird die Häufigkeit der tauben Samen benutzt, um über die Sortendifferenzen der Gonenkonkurrenz und den Einfluß der Eizellen- und Pollenkomplexe Aussagen zu machen. Dann ist aber auch die Bedeutung der verschiedenen Variabilitätskomponenten in den Sorten und ihr Zusammenhang mit den einzelnen Komplexen zu prüfen.

B. Material und Methode

Verwendet wurden Arten und Bastarde von *Oenothera*. Die Ausgangsarten waren so miteinander gekreuzt, daß jeder Eizellenkomplex mit möglichst vielen Pollenkomplexen und umgekehrt jeder Pollenkomplex mit möglichst vielen verschiedenen Eizellenkomplexen

jedoch, daß die zwei letzten Variabilitätskomponenten der Analyse gesichert größere Werte für ihre Varianz ergeben. Es müssen also im Material noch nicht-zufällige Variationsursachen versteckt sein, die auf diese beiden Faktoren praktisch gleich stark wirken, aber bei der gewählten Versuchsanordnung nicht erfaßt werden können.

Ursprünglich war geplant, das ganze Material nach dem Einfluß der Pollen- und Eizellenkomplexe und ihrer Wechselwirkung zu analysieren. Aus praktischen Gründen mußten die Aufzuchten über mehrere Jahre verteilt werden, wobei einzelne Kombinationen zum Vergleich in mehreren Jahren geprüft wurden. Bei der Untersuchung dieser Wiederholungsaufzuchten (Teil II) stellte sich heraus, daß einmal zwischen den Jahren erhebliche Differenzen vorhanden sind, und daß zum anderen diese Unterschiede für verschiedene Sorten

Tabelle 3. *Endanalyse für den Vergleich von 83 Sorten*

Variationsursache	Freiheitsgrade	$V = s^2$	$F_1 = V/V_{\text{Rest}}$	P	F_t^*	P
Total	4149	341,35				
Zwischen Einzelpflanzen	829	1 637,66				
Zwischen Sorten	82	15 568,23	887,1	< 0,01	92,73	< 0,001
Zwischen Pflanzen innerhalb der Sorten	747	108,47	6,11	< 0,01	143,53	< 0,001
Innerhalb der Pflanzen	3320	17,66	1,01	> 0,05		
Zwischen Kapselstellungen	4	10,22	1,72	> 0,05	1,24	> 0,05
Kapselstellung $\times$ Sorte	328	18,82	1,07	> 0,05	2,29	< 0,01
Rest	2988	17,55				
Zufall, $V\Phi$ für $n=100$	99	8,21			2,14	< 0,01

* Für den Vergleich der jeweils durch die Klammer verbundenen Varianzen.

in verschiedener Richtung liegen können. Eine rechnerische Korrektur der einmaligen Aufzuchten mit Hilfe der Kovarianzanalyse an Hand der vorliegenden Vergleichsgruppen kann deshalb nicht durchgeführt werden.

Aus diesen Gründen ist eine Weiterführung der Varianzanalyse durch Zerlegung der Variabilität „zwischen den Sorten“ in die darin enthaltenen Komponenten „Wirkung des Eizellenkomplexes“, „Wirkung des Pollenkomplexes“ und „Wechselwirkung zwischen Eizellen- und Pollenkomplex“ am Gesamtmaterial nicht möglich. Um trotzdem einige Aussagen machen zu können, wurden verschiedene Wege eingeschlagen.

b) Prüfung der Sortendifferenzen. Zur Erlangung einer ersten Übersicht wurden in Tabelle 1 und 2 die Mittelwerte der 83 vollständig untersuchten Sorten zusammengestellt (arabische Ziffern) und diese ergänzt durch die Mittelwerte der weniger vollständig untersuchten Sorten (kursive Ziffern in Tabelle 1).

Für die flavens-Bastarde (Teil I, Tabelle 11) wurde die Häufigkeit angegeben, mit der der jeweilige Pollenkomplex in der Eizelle auftrat (nähere Begründung Teil I, S. 492). Aus den %-Zahlen lassen sich durchschnittliche Werte berechnen für das Durchsetzungsvermögen eines jeden Pollenkomplexes gegenüber beliebigen Eizellenkomplexen und von beliebigen Pollenkomplexen gegenüber einem bestimmten Eizellenkomplex (Tabelle 1). Diese durchschnittlichen Werte sind aber, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, mit manchen Unsicherheitsfaktoren belastet und dürfen daher nur für eine erste, summarische Orientierung verwendet werden. Für Sorten, die den gleichen Pollenkomplex enthalten, weichen die Werte im allgemeinen nur relativ wenig vom Durchschnitt der betreffenden Zeile ab, während für jeden Eizellenkomplex bei Kombination mit verschiedenen Pollenkomplexen viel größere Schwankungen zu verzeichnen sind.

Weitere Anhaltspunkte lassen sich auf andere Weise gewinnen. Aus der Restvarianz der Varianzanalyse der 83 Sorten können die Minimumwerte für gesicherte Differenzen

zwischen den Mittelwerten berechnet werden. Diese sind (in Winkelgraden) $D = 4,08^\circ$ für $P = 0,05$ und $D = 5,37^\circ$ für $P = 0,01$. Aus den 83 Sorten können 3403 Vergleichspaare gebildet werden. Davon sind insgesamt 2416 Differenzen gut gesichert ($P < 0,01$) und nur 987 nicht gesichert ($P > 0,01$). (Diese Differenzen sind natürlich nicht im statistischen Sinne „unabhängige Beobachtungen“, sondern teilweise miteinander korreliert, aber ihre Verteilung kann trotzdem für die hier angestrebte qualitative Beurteilung herangezogen werden.) Für diese Prüfung dürfen nicht die Mittelwerte aus den %-Zahlen genommen und dann in Winkelgrade umgerechnet werden, sondern es müssen die Mittelwerte aus den transformierten Daten verwendet werden, die der Berechnung der Varianzen zugrunde gelegt wurden. Die Differenzentabelle, die Aufschluß darüber gibt, welche Unterschiede im einzelnen gesichert

Tabelle 4. Prüfung der Differenzen zwischen den Sorten innerhalb der durch die Herkunft der Komplexe bestimmten Gruppen

Komplexe aus ♀ ♂		Anzahl		davon Differenzen	
		Sorten	Vergleichs- paare	gesichert mit $P < 0,01$	un- gesichert ($P > 0,01$)
<i>biennis</i> (<i>balbicans</i>) × <i>biennis</i> (<i>rubens</i>)		24	276	106	170
<i>biennis</i> (<i>balbicans</i>) × nicht- <i>biennis</i>		29	406	251	155
nicht- <i>biennis</i> × <i>biennis</i> (<i>rubens</i>)		13	78	58	20
nicht- <i>biennis</i> × nicht- <i>biennis</i>		17	136	115	21

Tabelle 5. Statistische Sicherung der Differenzen zwischen je zwei Sorten bei Ordnung der Vergleichspaare nach den Pollen- bzw. Eizellenkomplexen

	Vergleichs- paare	Differenzen	
		gesichert mit P < 0,01	un- gesichert (P > 0,01)
Vergleichspaare, geordnet unter Berücksichtigung der Pollenkomplexe			
<i>rubens</i> verglichen mit <i>rubens</i>	666	335	331
nicht- <i>rubens</i> verglichen mit nicht- <i>rubens</i>	1035	787	248
<i>rubens</i> verglichen mit nicht- <i>rubens</i>	1702	1294	408
Vergleichspaare, geordnet unter Berücksichtigung der Eizellenkomplexe			
<i>balbicans</i> verglichen mit <i>balbicans</i>	1378	818	560
nicht- <i>balbicans</i> verglichen mit nicht- <i>balbicans</i>	435	355	80
<i>balbicans</i> verglichen mit nicht- <i>balbicans</i>	1587	1243	347

sind, wurde wegen ihres Umfangs hier nicht wiedergegeben. Aus der Gesamtheit dieser Vergleichspaare sind aber auch nicht alle vom gleichen Interesse. In den Tabellen 3—6 ist deshalb das Material unter verschiedenen Gesichtspunkten geordnet und in abgekürzter Form geboten.

Um einen Überblick über die Verhältnisse im Gesamtmaterial zu bekommen, wurden alle Kombinationen eingeteilt in solche mit einem Pollenkomplex aus einer *biennis*-Rasse (*rubens*) und „sonstige“, und beide Gruppen wurden unterteilt in Verbindungen mit einem *biennis*-Eizellenkomplex (*balbicans*) und andere. Innerhalb dieser 4 getrennten Gruppen wurden alle Differenzen geprüft. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 enthalten. In Tabelle 5 wurden die Vergleichspaare zusammengestellt unter Berücksichtigung der Pollenkomplexe, aber bei Vernachlässigung der Eizellenkomplexe und umgekehrt. Eine feinere Aufgliederung entsteht, wenn alle Sorten herausgenommen werden, die einen bestimmten Pollenkomplex enthalten, und ihre Differenzen untereinander geprüft werden (Tabelle 6) und ebenso in bezug auf die Eizellenkomplexe verfahren wird (Tabelle 7).

Bei der Deutung der Unterschiede ist zu beachten, daß die Sortendifferenzen zum Teil mit den Jahresdifferenzen zusammenfallen (vgl. Teil II) und die Sicherung deshalb nur für die beiden tatsächlich verglichenen Stichproben gilt. Für Sorten, die nicht im gleichen Jahr

angebaut wurden, kann nicht gesagt werden, ob ein Unterschied als Sorten- oder Jahresdifferenz zu deuten ist. Eine Verallgemeinerung ist deshalb nicht möglich.

Trotz dieser Unsicherheit für einzelne Differenzen lassen diese Tabellen erkennen, daß immer dann, wenn der Pollenkomplex konstant gehalten wird, relativ wenige gesicherte Differenzen auftreten, der Einfluß der wechselnden Eizellenkomplexe also gering ist. Die Vergleiche für Kombinationen, die jeweils den gleichen Eizellenkomplex enthalten, zeigen den wesentlich größeren Einfluß der wechselnden Pollenkomplexe.

Im allgemeinen besteht eine relativ gute Übereinstimmung zwischen je zwei Sorten, wenn sie sowohl im Eizellen- wie im Pollenkomplex einander ähnlich sind. Wenn die Sorten miteinander verglichen werden, die zwar alle einen *balbicans*-Eizellenkomplex, aber in Kombination mit verschiedenen Pollenkomplexen aus nicht-*biennis*-Arten enthalten, oder umgekehrt den Pollenkomplex einer *biennis*-Rasse zusammen mit beliebigen, nicht-*biennis*-Eizellenkomplexen, so nimmt der Anteil der nicht-gesicherten Differenzen zu, während bei Vergleichspaaren, deren Partner sich sowohl in den Eizellen wie in den Pollenkomplexen unterscheiden, fast alle Differenzen gesichert sind.

Tabelle 6. Vergleich der Mittelwerte zwischen Sorten mit gleichen Pollenkomplexen

Pollenkomplex	Anzahl der Sorten	Vergleichspaare	Differenzen	
			gesichert mit $P < 0,01$	ungesichert ($P > 0,01$)
<i>rubens</i> M . .	9	36	17	19
<i>rubens</i> H . .	8	28	7	21
<i>rubens</i> A . .	5	10	4	6
<i>rubens</i> cr ₁ . .	8	28	9	19
<i>rubens</i> cr ₂ . .	7	21	15	6
<i>flavens</i> - s . .	9	36	21	15
<i>flavens</i> + s . .	5	10	4	6
<i>flavens</i> Grado	6	15	11	4
<i>stringens</i> . .	7	21	14	7
<i>elongans</i> . .	9	36	25	11
<i>punctulans</i> .	5	10	9	1
<i>curvans</i> . .	5	10	4	6
Summe		262	140	122

e) **Varianzanalyse einzelner Sortengruppen.** Wenn auch die geplante Zerlegung der Sortenvarianz durch die Wechselwirkung mit den Jahren am Gesamtmaterial nicht möglich ist, läßt sich diese Prüfung doch an einem begrenzten Teil durchführen.

Eine Auswertung durch Vergleich aller Aufzuchten eines Jahres ist nicht möglich, weil eine weitere Forderung für jede eingehende statistische Auswertung besagt, daß jede Variabilitätsursache auf alle zu vergleichenden Werte die gleiche Einflußmöglichkeit gehabt haben muß. Da nun nicht alle Kombinationen gleichzeitig geprüft wurden, entfällt in einem Jahr z. B. der Einfluß mehrerer Pollenkomplexe für den Mittelwert einiger Eizellenkomplexe und umgekehrt.

Die Betrachtung der Tabelle 1 zeigt, daß die Werte für Kombinationen mit dem Pollen von *Oe. suaveolens* fast immer und von *Oe. Cockerelli* sehr häufig über 50% liegen, während die übrigen weit darunter bleiben. Es fragt sich also, ob der Einfluß der Pollenkomplexe durchweg so viel größer ist als der der Eizellenkomplexe, oder ob er durch diese sehr großen Unterschiede überschätzt werden könnte. Um diese Fehlerquelle zu vermeiden, wurden beide Gruppen getrennt bearbeitet.

Aus dem Material des ersten Versuchsjahres wurden diejenigen Eizellen- und Pollenkomplexe ausgewählt, die in möglichst vielen Kombinationen vorhanden waren, so daß eine Auswertungsgrundlage mit möglichst wenig Fehlstellen gegeben war (vergleiche Ziffern in Tabelle 1 und 2). Dies sind die

Kombinationen der Eizellenkomplexe der *Oe. biennis*-München, *biennis* A2a, *biennis* *apetala* *cruciat* und *biennis* *apetala* *erweitert* mit den Pollenkomplexen der 5 *biennis*-Rassen (die genannten und *biennis*-Hannover) und von *Oe. strigosa* (*stringens*) und *Oe. muricata* (*curvans*). Eine weitere Prüfung ist möglich mit den gleichen Eizellenkomplexen und den Pollenkomplexen der *Oe. suaveolens sulfurea* und gelb und *Oe. Cockerelli*.

Tabelle 7. Vergleich der Mittelwerte zwischen Sorten mit gleichen Eizellenkomplexen

Eizellenkomplex	Anzahl der Sorten	Vergleichs- paare	Differenzen	
			gesichert mit P < 0,01	ungesichert P > 0,01
<i>balbicans</i> M.	10	45	22	23
<i>balbicans</i> H.	9	36	15	21
<i>balbicans</i> A.	10	45	27	18
<i>balbicans</i> cr ₁	12	66	44	22
<i>balbicans</i> cr ₂	12	66	47	19
<i>salbicans</i> (<i>Oe. suaveolens sulfurea</i>)	5	10	7	3
<i>salbicans</i> (<i>Oe. suaveolens gelb</i>) . .	6	15	13	2
<i>deprimens</i>	3	3	2	1
<i>curtans</i>	6	15	13	2
<i>excellens</i>	7	21	16	5
Summe		322	206	116

Tabelle 8. Summe der Winkelgrade aus den Werten von 50 Kapseln je Sorte für einige gleichzeitig untersuchte Sorten, als Grundlage für die Endanalyse in Tabelle 9
Arabische Ziffern = beobachtet; kursive Ziffern = rechnerisch ergänzt

Art	♀	biennis M	biennis A ₂ a	biennis ap. cruc.	biennis ap. erweitert	
	♂	Komplex	rubens M	rubens A ₂ a	rubens-cr ₁	rubens-cr ₂
I	biennis München	rubens M	982,3	704,6	1017,6	1112,1
	biennis Hannover	rubens H	821,2	767,0	973,6	1016,7
	biennis A ₂ a	rubens A ₂ a	650,8	874,8	827,3	1345,2
	biennis apetala cruciat	rubens-cr ₁	769,8	693,9	456,2	612,5
	biennis apetala erweitert	rubens-cr ₂	578,2	808,0	1082,8	614,6
	strigosa	stringens	803,6	834,0	836,6	797,0
	muricata	curvans	926,5	887,4	974,9	901,1
II	suaveolens sulfurea	flavens —s	2341,4	2380,5	2440,6	2410,3
	suaveolens gelb	flavens +s	2356,1	2299,7	2524,5	2434,6
	Cockerelli	elongans	2437,5	2464,3	2496,2	2550,7

In diesen Gruppen sind nur 2 Fehlstellen vorhanden, nämlich *Oe. biennis* A₂a (*albicans* A·*rubens* A) und *Oe. biennis* München × *Cockerelli* (*balbicans* M·*elongans*). Diese Lücken wurden rechnerisch ausgefüllt (nach der Methode der „missing plots“ nach WEBER 1957). Zur Berechnung ist zu erwähnen, daß der Varianzanalyse auch hier die Beobachtungswerte je Kapsel zugrunde gelegt wurden, also 50 Beobachtungen je Sorte. Die Fehlstellen wurden ausgefüllt durch den theoretischen Wert für die Summe aller Beobachtungen der betreffenden Sorte. Hierbei trägt dieser Wert zur Binnenklassenvarianz nichts bei, während bei der Zerlegung der Zwischenklassen(= Sorten)varianz in ihre drei Komponenten der Einfluß der fehlenden Sorten ein Minimum wird und die Fehlstelle bei den Freiheitsgraden für die Wechselwirkungen berücksichtigt wird.

Die Varianzanalyse geht wieder von den transformierten Beobachtungswerten, d. h. von der Häufigkeit der tauben Samen je Kapsel, umgerechnet in Winkelgrade, aus, wobei aber auf Grund der oben getroffenen Feststellungen (vgl. Abschnitt C Ia) zur Vereinfachung der Einfluß der Kapselstellungen und ihrer Wechselwirkungen mit in die Restvarianz einbezogen wird. Die Summe der Winkelgrade aller Kapseln für die einzelnen Sorten sind in Tabelle 8 gegeben, dazu die beiden Endanalysen in Tabelle 9.

Tabelle 9. Endanalysen zu Tabelle 8

Variationsursache	Freiheits- grade	s ²	F	P
Endanalyse I				
Total	1349	37,6		
Zwischen Sorten	26	715,4	19,291	< 0,01
Zwischen Eizellenkomplexen	3	537,7	1,177	> 0,05
Zwischen Pollenkomplexen	6	1037,8	1,639	> 0,05
Wechselwirkung ♀ × ♂	17	633,0		
In Sorten = Rest	1323	37,1	17,069	< 0,01
Endanalyse II				
Total	549	19,2		
Zwischen Sorten	10	124,6	7,241	< 0,01
Zwischen Eizellenkomplexen	3	190,1	3,77	> 0,05
Zwischen Pollenkomplexen	2	212,0	4,206	> 0,05
Wechselwirkung ♀ × ♂	5	50,4		
In Sorten = Rest	539	17,2	2,929	0,05—0,01

Tabelle 10. Vergleich der durchschnittlichen Varianzen für die einzelnen Variabilitätskomponenten in verschiedenen Sortengruppen (hierfür wurden die Werte aller Sorten verwendet, die in Tabelle 8, Teil I, S. 488—490, enthalten sind)

Variationsursache	a in 4 biennis- Rassen		b in 20 Bastarden zwischen 5 biennis-Rassen		F a/b	P
	Fr. gr.	s ²	Fr. gr.	s ²		
Total	362	17,74	1171	30,15	1,70	< 0,01
Zwischen Kapselstellungen	42	22,35	116	22,26	1,00	> 0,05
Zwischen Pflanzen	59	29,45	200	99,22	3,37	< 0,01
Rest	261	14,35	855	15,06	1,05	> 0,05
	in 9 Arten		in allen Bastarden			
Total	607	19,92	4711	49,04	2,46	< 0,01
Zwischen Kapselstellungen	62	16,71	440	25,66	1,54	0,05—0,01
Zwischen Pflanzen	104	40,74	843	179,05	4,39	< 0,01
Rest	441	15,46	3428	20,07	1,30	< 0,01

Diese Endanalysen zeigen, wie schon aus der Gesamtanalyse zu ersehen war, daß die Varianz „zwischen den Sorten“ gesichert größer ist als „innerhalb der Sorten“. Alle drei Komponenten der Sortenvarianz, nämlich die Variabilität zwischen Eizellenkomplexen, zwischen Pollenkomplexen und die Wechselwirkung zwischen beiden, haben eine Wirkung, die gesichert größer ist als die Restvarianz. Der Einfluß der Pollenkomplexe ist dabei am größten, danach folgen die Unterschiede unter der Wirkung der Eizellenkomplexe und schließlich die Wechselwirkungen. Die beiden letzteren Komponenten sind aber unter sich nicht gesichert verschieden.

Tabelle 11. Durchschnittliche Varianzen für die einzelnen Variabilitätskomponenten bei
mit den entsprechenden Varianzen
a) Pollen-

Vergleichssorte	biennis M		biennis H		biennis A ₂ a		biennis apetala cruciat		biennis apetala erweitert	
	rubens M		rubens H		rubens A		rubens-cr ₁		rubens-cr ₂	
Variationsursache	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ₂
Total	441	17,72	426	58,34	289	40,45	387	23,63	392	46,17
Zwischen Kapseln .	41	23,94	35	24,22	24	12,95	42	14,31*	37	32,52
Zwischen Pflanzen .	76	43,45	80	234,86*	53	135,01	66	71,60	67	160,99*
Rest.	324	10,89	311	16,77*	212	19,92	279	13,69*	288	21,21*

* = mit $P < 0,01$ gesichert gegen die entsprechende Varianz der Stammart des Pollen-

b) Eizellen-

Vergleichssorte	biennis M		biennis H		biennis A ₂ a		biennis apetala cruciat		biennis apetala erweitert		suaveolens sulfurea	
	balbicans M		balbicans H		balbicans A		balbicans-cr ₁		balbicans-cr ₂		salbicans flavens-s	
Variationsursache	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²	Fr.-gr.	s ²
Total	539	27,91	460	28,75	534	21,38	735	51,53	676	27,00	225	23,62
Zwischen Kapseln .	44	17,45	40	26,75	54	12,93	70	25,05	71	26,04	30	25,73
Zwischen Pflanzen .	99	69,10	84	87,71 ⁰	93	57,69	125	193,59 ⁰	115	73,44	37	49,24
Rest.	396	18,77	336	14,24	387	13,83	540	22,08	490	16,24 ⁰	158	17,22

⁰ = mit $P < 0,01$ gesichert gegen die entsprechende Varianz der Stammart des Eizellen-

II. Vergleich der Variabilität

Nachdem festgestellt wurde, daß beide in einer Sorte vereinigten Komplexe auf die durchschnittliche Häufigkeit der tauben Samen einwirken, bleibt noch zu prüfen, ob sich die genetische Struktur nur hierin bemerkbar macht, oder ob die verschiedenen Sorten außerdem in unterschiedlicher Weise für Umwelteinflüsse empfindlich sind. Als Maß hierfür kann die Variabilität zwischen den Pflanzen und zwischen den Kapselstellungen innerhalb der Sorten verwendet werden.

Die entsprechenden Varianzen für die einzelnen Sorten sind in Teil I (Tabelle 8, S. 488/89) enthalten. Für das ganze zur Verfügung stehende Material wurden durch Addition der Summe der quadratischen Abweichungen der einzelnen Variabilitätskomponenten und Division durch die entsprechende Summe der Freiheitsgrade mittlere Varianzen berechnet. Ebenso kann verfahren werden für Gruppen von Sorten, die unter bestimmten Gesichtspunkten zusammengestellt wurden. So sind die durchschnittlichen Varianzen für die *biennis*-Rassen, für die übrigen Ausgangsarten, für alle Arten zusammen, für die Bastarde zwischen den *biennis*-Rassen und für alle Bastarde zusammen berechnet (Tabelle 10). Diese können zueinander in Beziehung gesetzt werden.

Es zeigt sich durch die Berechnung der Varianzverhältnisse (F-Werte), daß die Variabilität innerhalb der *biennis*-Rassen und innerhalb der übrigen Arten sowohl für die Unterschiede zwischen den Pflanzen (bei den Arten größer) wie für die Kapselstellungen (bei den *biennis*-Rassen größer) gesichert verschieden ist, während die Restvarianz in beiden Gruppen übereinstimmt. Der Vergleich

Zusammenfassung der Sorten und ihren Pollen- bzw. Eizellenkomplexen und Vergleich der Stammart des Komplexes

komplexe

suaveolens sulfurea		suaveolens gelb		suaveolens Grado		strigosa		Cockerelli		chica-ginensis		muricata	
flavens-s		flavens + s		flavens-Gr		stringens		elongans		punctulans		curvans	
Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²
632	66,92	347	27,73	245	37,91	407	100,52	567	21,39	382	104,26	196	27,37
57	31,38	32	20,54	20	26,80	34	38,88 *	70	23,52	32	38,96	16	9,46
111	249,47	63	75,73	45	118,43	78	403,94 *	98	34,34 *	70	438,79	36	77,89
464	27,61	252	16,64	180	19,02	295	27,40	399	17,84	280	28,09	144	16,73

komplexes.

komplexe

suaveolens gelb				strigosa		Cockerelli		chica-ginensis		muricata		atrovirens	
salbicans		flavens + s		deprimens		curtans		excellens		rigens		pingens	
Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²	Fr.-gt.	s ²
338	89,56	101	200,40	142	40,43	333	136,15	460	42,47	49	20,91	49	112,34
28	29,79	9	18,48	12	7,45	28	65,72	40	26,46	4	16,88	4	19,55
62	374,74 ⁰	23	771,21	26	136,55	61	559,98 ⁰	84	152,32	9	32,43 ⁰	9	462,59 ⁰
248	25,02	69	33,87	104	20,20	244	38,28 ⁰	336	16,91	36	18,47	36	35,09 ⁰

komplexes

der *biennis*-Rassen mit den *biennis*-Bastarden ergibt, daß bei den letzteren die Unterschiede zwischen den Pflanzen größer sind, während im übrigen die Variabilität gleich groß ist. Bei den Ausgangsarten sind schließlich die durchschnittlichen Varianzen für alle Komponenten deutlich geringer als bei den Bastarden. Letztere sind also in jeder Hinsicht stärker variabel, d. h. für die unkontrollierten Umwelteinflüsse stärker ansprechbar.

Das Material kann weiter in einzelne Gruppen zerlegt werden in der Weise, daß die durchschnittlichen Varianzen der Bastarde, die einen bestimmten Komplex enthalten, verglichen werden mit den entsprechenden Werten der Art, aus der der betreffende Komplex stammt (Tabelle 11). Diese Zusammenstellung zeigt deutlich, daß die vergrößerte Variabilität der Bastarde sowohl unter dem Einfluß des Pollen- wie des Eizellenkomplexes stehen und sich in allen drei Varianzkomponenten bemerkbar machen kann, aber vorwiegend die Variabilität zwischen den Pflanzen betrifft. Die Betrachtung der Tabelle 8 aus Teil I zeigt darüber hinaus, daß diese vergrößerten Varianzen vor allem auftreten, wenn Kreuzungen zwischen verschiedenen Arten vorliegen.

D. Diskussion

Wie bereits dargelegt wurde, ist die Häufigkeit der tauben Samen in der Nachkommenschaft nach Selbstung einer Pflanze ein Maß für die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage zwischen den beiden in der betreffenden Sorte ver-

einigten Komplexen, die ihrer Funktion in den Ausgangsarten nach als Eizellen- und Pollenkomplex bezeichnet werden können. Für den Vergleich wurden 111 Sorten herangezogen, davon 83 gut untersucht und 28 mit weniger vollständigen Daten. Die eingangs gestellte Frage war, ob nur die genetische Konstitution des Pollenkomplexes für sein Auftreten in der Eizelle verantwortlich ist, oder ob die Konkurrenzfähigkeit von der Kombination mit bestimmten Eizellenkomplexen beeinflusst wird.

Das Ergebnis der dargestellten Untersuchungen ist, daß zwischen den Sorten (Arten und Bastarden) große Unterschiede im Auftreten der Pollenkomplexe in den Eizellen bestehen. Einzelne Pollenkomplexe können sich gegenüber den Eizellenkomplexen sehr stark durchsetzen, so daß sie zum Teil sogar diese ihrerseits verdrängen und über 50% der Eizellen liefern, während andere nur ein geringes Durchsetzungsvermögen aufweisen. Diese ganz großen Unterschiede sind nur auf die Wirkung der Pollenkomplexe zurückzuführen. Es wurde kein Eizellenkomplex gefunden, dessen Einfluß sich gegenüber allen Pollenkomplexen so gleichmäßig bemerkbar macht. Innerhalb jeder dieser beiden Gruppen von Pollenkomplexen mit „starker“ und „schwacher“ Durchschlagkraft sind für die Sortendifferenzen der Einfluß des Pollen- und des Eizellenkomplexes sowie ihre Wechselwirkung von fast gleich großer Bedeutung.

Es liegen also Anhaltspunkte dafür vor, daß im ganzen gesehen vom Pollenkomplex einer Kombination der stärkere Einfluß auf die Gonenkonkurrenz um den Embryosack ausgeht, daß aber der Eizellenkomplex hieran nicht nur passiv beteiligt ist, sondern das Durchsetzungsvermögen des Pollenkomplexes beeinflusst, und daß darüber hinaus eine Wechselwirkung zwischen den Antagonisten besteht in der Weise, daß das Ergebnis für jede Kombination spezifisch ist und nicht aus der durchschnittlichen Reaktion der beiden beteiligten Komplexe vorausgesagt werden kann. Die ursprünglichen Beobachtungen von RENNER (1941) über die Bedeutung der Pollenkomplexe für die Gonenkonkurrenz werden hierdurch bestätigt, sind aber dahingehend zu revidieren, daß auch die genetische Konstitution der Eizellenkomplexe mitspricht bei einer Entscheidung darüber, in welchem Maße der Pollenkomplex verdrängt wird.

Aus den genetischen Anlagen der beiden Komplexe, also der konkurrierenden Gonen, ergibt sich aber nicht ein starr festgelegtes Konkurrenzverhältnis, sondern durch die genetischen Faktoren wird bestimmt, in welchen Grenzen dieses variieren und in welcher Weise es durch physiologische Einflüsse von seiten der Mutterpflanze her verändert werden kann. In den Arten bestehen dabei relativ stabile Beziehungen. Durch die Bastardierung wird dieses Gleichgewicht zwischen den beiden aufeinander eingestellten Partnern gestört, und die neu kombinierten Komplexe zeigen eine erhöhte Labilität ihrer Reaktionsweise, so daß das ganze System auf äußere Einflüsse mit verstärkten Ausschlägen reagiert. Die Differenzen sowohl zwischen gleichzeitig aufgezogenen Pflanzen wie zwischen Wiederholungsaufzuchten sind bei den Bastarden durchschnittlich viel größer als bei den Arten. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Bastarden werden auch um so größer, je verschiedener die Arten sind, aus denen die beiden neu kombinierten Komplexe stammen. Am extremsten ist diese Erhöhung der Variabilität bei den Komplexen *stringens* aus *Oe. strigosa* und *elongans* aus *Oe. Cockerelli*. Beide treten in ihren Stammarten praktisch nicht in den Samen-

anlagen auf. In Bastarden mit Eizellenkomplexen, die ihrerseits in ihrer Ausgangsform ein starkes Durchsetzungsvermögen aufweisen, lassen sich alle Zwischenstufen von fast völliger Verdrängung durch den jeweiligen Eizellenkomplex bis zu weitgehendem Überwiegen in den Samenanlagen feststellen, sogar in Kombination mit Eizellenkomplexen, die ihrerseits den in der Ausgangsart zugeordneten Pollenkomplex weitgehend verdrängen.

Bei den hier getroffenen Feststellungen über den Einfluß der beiden in einer Sorte vereinigten Komplexe bleibt jedoch die Frage offen, auf welchem Wege die genetischen Faktoren ihre Wirkung entfalten. Es stehen hierfür grundsätzlich zwei Möglichkeiten offen. Zum ersten könnten die betreffenden, für das Wachstum der Gonen und ihre Differenzierung zum Embryosack verantwortlichen Gene nur in den Gonen selber wirksam werden, so daß sie durch ihre genetische Konstitution als „stark“ oder „schwach“ gekennzeichnet sind und hierdurch ihre Reaktion auf die Umwelt und den Partner bestimmt wird. Die Bildung des Embryosackes wäre dann das Ergebnis eines echten Konkurrenzkampfes zwischen den beiden Gonen, in dem die Mutterpflanze nur als Vermittler der Umwelteinflüsse dient, ohne daß irgendwelche genetisch bestimmten Reaktionen von ihrer Seite her mitspielen würden. Die Ausgangssituation am Ende der Meiosis wäre dann für eine Gone der Konstitution x immer die gleiche, nur von ihren eigenen Genen her bestimmt und unabhängig davon, ob die Mutterpflanze die Konstitution $x \cdot y$ oder $x \cdot z$ besitzt.

Die andere Möglichkeit ist folgende: Die Mutterpflanze dient nicht nur als passiver Vermittler der Umwelteinflüsse, sondern übt allein durch ihre genetische Konstitution bereits einen Einfluß auf die in der Samenanlage herrschenden Bedingungen und damit auf die Gonen aus. Eine Gone mit dem Komplex x ist dann primär in einer anderen Situation auf einer Mutterpflanze $x \cdot y$ als auf einer der Konstitution $x \cdot z$. Dieser genetische Einfluß wirkt, zusammen mit der Lage der Gone in der Samenanlage und den Umweltbedingungen, die durch die Mutterpflanze vermittelt werden, auf die Gonen ein, die in Abhängigkeit von ihrem eigenen Genom darauf mit verstärktem oder geschwächtem Wachstum reagieren. Die direkte Konkurrenz zwischen den beiden heranwachsenden Gonen würde dann erst im letzten Stadium der Entwicklung wirksam werden, wenn eine der beiden so groß geworden ist, daß sie als Zentrum wirkt, das, so wie es von anderen Erscheinungsformen der Musterbildung in pflanzlichen Geweben her bekannt ist, die Differenzierung gleichartiger Strukturen in seiner Umgebung verhindert, und dann unabhängig von ihrer genetischen Struktur sein.

Im ersten Fall wäre die Konkurrenz das Ergebnis einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Gonen, während im zweiten Fall die entscheidenden Beziehungen zwischen jeder Gone und der Mutterpflanze wirken würden. Über die physiologischen Bedingungen in der Samenanlage und erst recht über die Entwicklungsphysiologie des Embryosackes liegen bisher keinerlei Untersuchungen vor, und so müssen beide Möglichkeiten offenbleiben, da sie auf Grund der bisher bekannten, anatomischen Tatsachen über die Entwicklung des Embryosackes weder zu beweisen noch zu widerlegen sind.

Diese Untersuchungen an *Oenothera* hatten das Ziel, über die morphologisch-entwicklungsgeschichtliche Beschreibung der Ausbildung des Embryosackes, also des ♀ Gametophyten, hinaus zu Einsichten über die Ursachen zu gelangen,

von denen diese Entwicklung gelenkt wird. Sie zeigt, daß das Zusammenspiel zwischen genetischen und physiologischen Einflüssen entscheidend ist, wobei die genetischen Anlagen die Variationsbreite der Reaktionsnorm bestimmen, während die hier allgemein als physiologische Bedingungen umschriebenen Faktoren darüber entscheiden, in welchem Bereich diese Möglichkeiten realisiert werden, wobei vom Embryosack aus betrachtet die Mutterpflanze bereits „außen“ ist. Die Verhältnisse beim Gametophyten der höheren Pflanzen sind also grundsätzlich die gleichen wie beim Sporophyten, wo die Entwicklung ebenfalls durch das Zusammenwirken von Genen und Umwelteinflüssen bestimmt wird.

Zusammenfassung

1. Es wurden die Differenzen der Mittelwerte und der verschiedenen Varianzkomponenten für die Häufigkeit der tauben Samen bei einer größeren Anzahl von *Oenothera*-Sorten untersucht.

2. Die Pollenkomplexe haben ein sehr verschieden starkes Durchsetzungsvermögen gegenüber den Eizellenkomplexen.

3. Die Gonen mit dem Eizellenkomplex treten jedoch nicht nur passiv an die Stelle der unfähigen Gonen, die den Pollenkomplex enthalten, sondern die Eizellenkomplexe wirken mitbestimmend auf die Konkurrenzverhältnisse ein.

4. Es bestehen deutliche Wechselwirkungen zwischen den beiden in einer Sorte vereinigten Komplexen.

5. Die Konkurrenz zwischen genetisch verschiedenen Gonen um die Bildung des Embryosacks wird durch das Zusammenwirken von genetischen und physiologischen Einflüssen bestimmt.

6. Die genetischen Faktoren bestimmen dabei weniger das Ausmaß der Konkurrenz zwischen den Gonen, als die Variationsbreite, innerhalb derer die Sorte auf Außeneinflüsse reagieren kann.

7. Dieser Variationsbereich ist für Arten relativ eng, in Bastarden dagegen extrem vergrößert.

Literatur

HARTE, C.: Untersuchungen zur Gonenkonkurrenz bei der Entwicklung des Embryosacks von *Oenothera*. 8. Congr. Int. de Botanique, C. R. des séances, Sect. VIII, S. 178—179, 1954. — Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. I. Die individuelle Komponente der Variabilität. Z. Vererb.-Lehre 89, 473—496 (1958). — II. Die Umweltkomponente der Variabilität. Z. Vererb.-Lehre 89, 497—507 (1958). — RENNER, O.: Kurze Mitteilung über *Oenothera*. IV. Über die Beziehungen zwischen Heterogamie und Embryosackentwicklung und über diplarrhene Verbindungen. Flora (Jena), N. F. 34, 145—158 (1940).

Prof. Dr. CORNELIA HARTE, Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN *SORDARIA MACROSPORA* AUERSW., KOMPENSATION
UND INDUKTION BEI GENBEDINGTEN ENTWICKLUNGSDEFEKTEN*

Von

K. ESSER und J. STRAUB

Mit 6 Textabbildungen, davon 1 farbige

(Eingegangen am 11. August 1958)

A. Einleitung

Um cyto genetische Probleme der Meiose bearbeiten zu können, suchten wir nach einem Objekt, an dem nicht nur die Aufspaltung von Genen sicher und leicht zu erkennen, sondern auch das chromosomale Verhalten in der Meiose zu verfolgen ist. In vorbereitenden Untersuchungen erwies sich der monözische selbst-compatible Ascomycet *Sordaria macrospora* als geeignet.

Dieser Pilz läßt sich leicht auf Agarmedien und in flüssigen, synthetischen Medien kultivieren. Aus einer Ascospore entsteht ein Myzelium, das nach 7 Tagen reife Perithezien trägt. Die 8 Sporen liegen linear angeordnet in den Asci. Eine asexuelle Fortpflanzung durch Konidiosporen oder andere Körper, die bei der genetischen Analyse störend wirken könnten, fehlt.

Zunächst allerdings könnte ein starkes Hindernis für genetische Analysen darin erblickt werden, daß die Unterscheidung zwischen Selbstungs- und Kreuzungsperithezien infolge der Selbstfertilität dieses Pilzes mit Schwierigkeiten verbunden ist. Darin liegt wohl der Grund, weshalb selbst-compatible Pilze bisher selten zu genetischen Versuchen herangezogen wurden. Die Kreuzungsperithezien können nämlich erst nach Sporenaussaat und Test der Myzelien als solche erkannt werden. Diese Schwierigkeiten umgingen WHEELER u. Mitarb. (s. die zusammenfassende Darstellung von WHEELER 1954) und MARKERT (1949), indem sie von der ebenfalls selbst-compatiblen *Glomerella cingulata* mehr oder weniger sterile Mutanten benutzten, die in ihrer Kontaktzone vielfach eine Anhäufung von Kreuzungsperithezien zeigten. Eine einfachere Methode zur Identifizierung der Kreuzungsperithezien besteht in der Verwendung von Farbspormutanten (HESLOT 1953 bei *Sordaria macrospora* und OLIVE 1956 bei *Sordaria fimicola*).

Wenn die beiden Kreuzungspartner verschiedene Gene für die Sporenfarbe besitzen, lassen sich Kreuzungsperithezien schon bei schwacher Vergrößerung an der Spaltung der Farbfaktoren in den Asci erkennen.

Unter den Nachkommen von röntgenbestrahlten Sporen der *Sordaria macrospora* fanden wir *Genmutanten der Sporenfarbe*, die als Markierer geeignet waren. Der größere Teil der isolierten Mutanten wies jedoch *Veränderungen im Fortpflanzungsverhalten* auf. Bei ihnen war die Bildung der Perithezien auf bestimmten Stufen blockiert. Das Stadium, in dem die Entwicklung in einer für jede Mutante charakteristischen Weise unterbunden war, konnte mikroskopisch

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Ministeriums für Wirtschaft und Verkehr NRW.

erkannt werden. Während die Mutanten in Einzelkulturen steril waren, ließen sie sich gegenseitig kreuzen. Die genetische Analyse dieses Phänomens führte zu einer Vorstellung über den Mechanismus der Kreuzbarkeit und die Sexualität monözischer, selbst-compatibler Ascomyceten, mit deren Hilfe die hierüber bereits vorliegenden Auffassungen (HÜTTIG 1935, GREIS 1941) korrigiert werden konnten. Die Interpretation unserer genetischen Versuche setzt eine genaue Kenntnis der Entwicklungsgeschichte von *Sordaria macrospora* voraus, zumal darüber in der bisherigen Literatur keine einheitliche Auffassung vorliegt.

B. Material und Methoden

Zu den vorliegenden Untersuchungen benutzten wir einen Stamm von *Sordaria macrospora* AUERSW., den wir vom CBS in Baarn, Holland, bezogen. Um die Homogenität des Wildstammes zu prüfen, isolierten wir von diesem Stamm 27 Ascii und säten die Sporen (216) einzeln aus. 181 Sporen keimten. Alle Myzelien waren selbstfertil. Sie unterschieden sich morphologisch nicht vom Ausgangsstamm. Wir wählten eines der Einzelspormyzelien als Ausgangskultur für unsere Experimente. Die Präparation und Aussaat der Sporen erfolgte nach den von RIZET und ENGELMANN (1949) angegebenen Methoden. Bei der Keimung der Sporen auf Pferdemitdekot-Agar und der folgenden Kultur der Myzelien auf Maismehldékot-Agar betrug die Temperatur 26–27° C.

Zur Auslösung von Genmutanten wurden mehrere tausend Sporen mit Dosen zwischen 20000 und 30000 r (100 kV) röntgenbestrahlt und davon insgesamt 3152 ausgesät. Die LD-50 lag bei etwa 24000 r. Da die Sporen von *Sordaria macrospora* infolge einer kurz nach der Membranbildung abgelaufenen Mitose zwei genetisch gleiche Kerne enthalten, waren die nach den Bestrahlungen erhaltenen Myzelien meist heteroxaryotisch. Sie wiesen vielfach Wachstumsanomalien oder Sterilitätserscheinungen auf. Um homogene Mutanten zu erhalten, wurden geeignet erscheinende Varianten mit dem Wildstamm rückgekreuzt. Durch Aussaat von Einzelsporen konnten wir auf diese Weise aus dem bestrahlten Material bisher 23 Mutanten isolieren (s. Tabelle 1).

Zu den entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen zogen wir die Pilzstämme in kleinen sterilen Feuchtkammern an. Diese wurden auf folgende Weise angefertigt: Auf einen Objektträger klebten wir mit Vaseline einen plangeschliffenen Glasring ($\varnothing$ 23 mm, Höhe 5 mm). Auf den Boden dieser Kammer gaben wir 2–3 Tropfen steriles Wasser. Dann wurde ein Tropfen 2%igen Nähragars auf ein Deckglas (24 x 24 mm) aufgetragen. Der Agar enthielt 4 Teile Maismehldékot und 1 Teil Nährsalzlösung [modifiziertes Westergaardmedium: 0,1% KNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄; 0,01% CaCl₂; 0,01% NaCl (ESSER 1956)]. Nach Erkalten des Agartropfens auf dem Deckglas beimpften wir mit einem Mycelstück von etwa 0,5 mm³ und legten das Deckglas mit dem Agartropfen nach unten auf den Glasring, dessen Oberkante vorher mit Vaseline leicht eingefettet wurde. Diese Mikrokammern gaben wir in eine feuchtgehaltene Petrischale ($\varnothing$ 10 cm) und bebrüteten die Kulturen bei 26° C.

Die bei den Versuchen zur Aufklärung des Induktionsmechanismus verwendeten flüssigen Nährmedien waren: 2%ige Biomalzlösung, Maisdekot und modifiziertes Westergaard-Medium mit 2% Saccharose.

C. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen

Die weiblichen Geschlechtsorgane (Ascogone) von *Sordaria macrospora* entstehen als schraubige Ausstülpungen der Hyphen (DANGEARD 1907). An ein Ascogon legen sich im Verlauf der weiteren Entwicklung benachbarte Hyphen an, die sich reich verzweigen und auf diese Weise die Hülle der Geschlechtsorgane bilden. Da keine Fusionsbrücken zwischen Ascogon und Hüllhyphen zu beobachten waren, nahm DANGEARD an, daß die Ascogone sich apandrisch zu den Perithezien entwickeln und die Befruchtung autogam erfolgt. DENGLER (1937) kam nach der Untersuchung von gefärbten Präparaten und Mikrotomschnitten zu der

Auffassung, daß die Fruchtkörperbildung bei diesem Pilz durch eine Gametangio-gamie eingeleitet wird. Sie beschreibt, daß die jungen Ascogone von fadenförmigen Hyphen, den Antheridien, befruchtet werden. Allerdings konnte sie kein Einwandern des männlichen Kerns in das weibliche Geschlechtsorgan beobachten. Da DENGLE bei *S. uvicola* und *S. Brefeldii* (wie DANGEARD bei *S. macrospora*) eine apandrische Entwicklung der Fruchtkörper nachweisen konnte, wäre es möglich, daß es sich bei den *S. macrospora*-Stämmen von DENGLE und DANGEARD um verschiedene Arten oder um verschiedene geographische Rassen gehandelt hat, deren Sexualverhalten unterschiedlich war.

I. Der Wildstamm

Alle Untersuchungen wurden als mikroskopische Dauerbeobachtungen am lebenden Material durchgeführt.

17—22 Std nach Beimpfen der Feuchtkammern mit Myzelstückchen beginnen die farblosen Myzelien mit der Ausbildung von Ascogonen. Die zunächst einzelligen, spiralig eingerollten Ascogone (Abb. 1, a) septieren sich im Verlauf von 1—1,5 Std in 3—5 Zellen (Abb. 1, b). Als nächster Entwicklungsschritt erfolgt die Bildung der primären und sekundären Hüllhyphen. Die primären können einen verschiedenen Ursprung haben. Sie wachsen entweder aus dem Ascogon (Abb. 2, a; 4 Beobachtungen) oder aus der Hyphenzelle, die das Ascogon abschnürte (Abb. 2, b; 28 Beobachtungen), oder einer ihr benachbarten Zelle heraus (Abb. 2, c; 14 Beobachtungen). Sie legen sich um das Ascogon, ohne einen geschlossenen Mantel zu bilden. Das vollständige Einhüllen des Ascogons geschieht durch die sekundären Hüllhyphen, deren Bildung etwa 30—60 min nach der Entstehung der primären einsetzt. Sie können entweder von der Traghyphye selbst oder von einer ihrer Verzweigungen ihren Ausgang nehmen. Nach 3 Std ist das Ascogon fast eingehüllt (Abb. 1, d). Im Verlauf der nächsten Stunden verdichtet sich die Hülle durch weiteres Hyphenwachstum. Das zum Protoperithezium gewordene Ascogon nimmt erheblich an Größe zu, und aus der äußersten

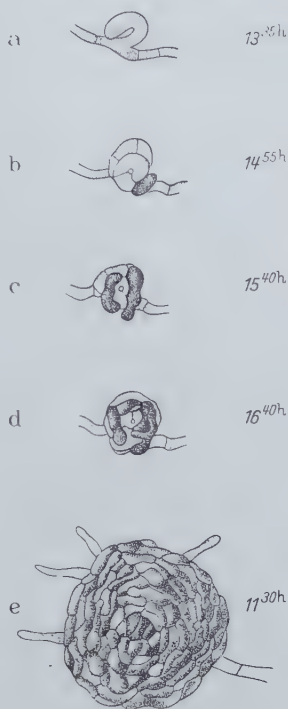


Abb. 1. Aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien eines Ascogons bis zum Protoperithezium beim Wildstamm von *Sordaria macrospora*. Zur Unterscheidung zwischen Ascogon und Hüllhyphen sind die letzteren dunkler gezeichnet. Nähere Erläuterungen s. Text (Vergr. 400 ×)

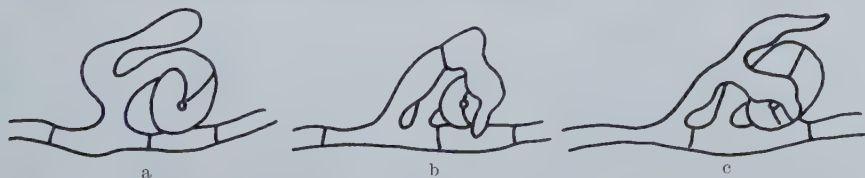


Abb. 2. Übersicht über den Ursprung der primären Hüllhyphen bei der Ascogonentwicklung. Erläuterungen s. Text

Hüllenschicht wachsen strahlenförmig Hyphenspitzen heraus (Abb. 1, e). Die weitere Entwicklung bis zum reifen Perithezium, die in Einzelheiten nicht mehr am lebenden Material beobachtet werden kann, ist nach 6—8 Tagen abgeschlossen.

Häufig konnte die Bildung von sog. Scheinascogonen festgestellt werden. Diese entstehen wie die Ascogone als Hyphenausstülpungen. Sie rollen sich sehr locker spiralig ein und verharren auf diesem Entwicklungsstadium. Die Hüllhyphenbildung bleibt bei diesen Organen aus.

Tabelle 1. Beschreibung der Mutanten von *Sordaria macrospora*. Unter Nr. 0 werden zum Vergleich die Merkmale des Wildstammes angegeben (Erläuterungen s. Text)

1	2	3	4	5	6		7	8	9
Nr.	Bezeichnung	Gen	Verhältnisse bei der Perithezienentwicklung	Myzeleigenschaften					
				Farbe	Wuchsform	Wachstums- geschwin- digkeit	Sporenfarbe und -anordnung	Perithezien- größe	
0	Wildstamm	+	fertile Perithezien	farblos	langgestreckte Hyphen	normal	schwarz; linear	normal	
1	<i>cana 1</i>	c_1	nur Mycel, keine Ascogone	rosa; Färbung tritt erst nach 14 Tagen ein	kurzzeitig; reich verzweigt	geringer	in Kreuzungs- perithezien grau		
2	<i>cana 2</i>	c_2		gelblich					
3	<i>rosea</i>	r	Ascogone, aber keine Protoperithezien	dunkelbraun	langgestreckte, dicke Hyphen, aus denen rhizoidartig lange dünnere Hyphen entspringen	geringer			
4	<i>citra</i>	cit		weißgelb	welliges Wachstum; hefeartig sprossende Hyphen	geringer			
5	<i>spadix</i>	spd		bräunlich	fedrig; Hyphen kurzzeitig und kurzästig, reich verzweigt	geringer			
6	<i>pallens</i>	p	wenige Protoperithezien, keine Perithezien	bräunlich					
7	<i>plumata</i>	pl		bräunlich					
8	<i>subfusca 1</i>	f_1	viele Protoperithezien, keine Perithezien	braun	wollig, fedrig				
9	<i>subfusca 2</i>	f_2							
10	<i>subfusca 3</i>	f_3						etwas geringer	
11	<i>lanosa 1</i>	l_1							
12	<i>lanosa 2</i>	l_2							

ist. Mutanten, die in allen makroskopisch und mikroskopisch erkennbaren Eigenschaften und auch in ihrem Kreuzungsverhalten (s. S. 737) übereinstimmen, wurden mit dem gleichen Namen benannt und durch einen mit dem Gensymbol verbundenen Index unterschieden.

In der vierten Spalte der Tabelle 1 ist verzeichnet, in welchem Stadium der Entwicklungszyklus bei den einzelnen Mutanten endet bzw. wo die Blockierung im Ablauf der Fruchtkörperbildung liegt. Die Mutanten 19—21 mit den Genen *n*, *ire* und *m* sind zwar selbstfertil, tragen aber insofern einen Defekt der Fruchtkörperbildung, als sie die Sporen nicht ausschleudern. In den Spalten 5—7 sind die vom Wildstamm abweichenden Myzeleigenschaften der Mutanten angegeben. Spalte 8 und 9 zeigen entsprechend die Merkmale der Sporenfarbe und der Perithezien. Aus den Spalten 5—9 ist zu ersehen, daß die analysierten Gene vielfach pleiotrop wirken; mit den Defekten der Fruchtkörperbildung sind häufig auch Veränderungen des Myzelcharakters, der Perithezienform und -größe sowie der Sporenfarbe verbunden. Die Mutanten 1—18 sind also nicht nur steril, sondern durch weitere vom Wildstamm abweichende Merkmale charakterisiert. So zeigt *c* graue Sporenfarbe; *spd* (dattelfarbig) bildet braunes Myzel. Es schien uns zweckmäßig, die einzelnen Sterilitätsgene (1—18) an Hand solcher morphologischer Merkmale zu symbolisieren. Nur die Gene, die äußerlich normal erscheinende, allerdings leere Perithezien hervorrufen, wurden als *sterilis* (*s*) bezeichnet.

Die Perithezien der selbstfertilen Mutante *crassa* (Nr. 23) enthalten Asci mit 8 normal ausgereiften, keimfähigen Sporen. Bei allen Kreuzungen mit *crassa* findet man in den Kreuzungsperithezien nur etwa 10% normale Asci; 15—17% der Asci haben 8 weiße, glasig aussehende, keimungsunfähige Sporen. Die restlichen 73—75% der Asci enthalten 4 schwarze und 4 weiße Sporen. Auf Grund dieser Befunde und unter Berücksichtigung ähnlicher Versuchsergebnisse an *Neurospora crassa* (McCLINTOCK 1945) kann man annehmen, daß die Eigenschaft „*crassa*“ (dickere Perithezien) durch Chromosomenmutation (Inversion oder reziproke Translokation) ausgelöst wurde. Infolge der Chromosomenmutation entstehen im Verlauf der Ascusentwicklung durch crossingover zwischen mutierten und normalen Chromosomen weiße, letale Sporen.

Die den Entwicklungszyklus betreffenden Defekte der Genmutanten lassen sich schematisch in übersichtlicher Form darstellen (Abb. 3).

Die in Abb. 3 und auch bei der Charakterisierung der Mutanten (Tabelle 1) angegebenen Verhältnisse der Perithezienentwicklung sind vereinfacht erfaßt. So ist z. B. für die Mutanten *cit*, *spd* und *p*, die sich in Kreuzungen als Nicht-Allele erweisen, angegeben, daß die Ascogone ausgebildet, aber nicht weiterentwickelt werden. Trotzdem ist die Sistierung der Entwicklung bei den 3 Mutanten nicht identisch. In der Entwicklungsgeschichte lassen sich zwar keine Differenzen finden, doch liegen verschiedene Genwirkungen vor. Die im folgenden Kapitel darzustellenden Kreuzungen bzw. Kompensationswirkungen werden dies veranschaulichen.

Bei der selbstfertilen Mutante *lu* (gelbe Sporen) fehlt die Ausbildung des schwarzen Pigmentes in den Sporenwänden. Durch diesen Defekt wird die Fähigkeit, Sporen auszuschleudern, aber nicht berührt. Die Mutante *ire* vollzieht die Entwicklung der Fruchtkörper normal bis zu dem Zeitpunkt, in dem über die Anordnung der Sporen im Ascus entschieden wird. Die Sporen dieser Genmutante sind ungeordnet und werden nicht ausgeschleudert; in Färbung und Keimungsfähigkeit gleichen sie denen des Wildstammes.

Es war von vornherein zu erwarten, daß bei der Untersuchung der genetischen Bedingungen für die Fruchtkörperbildung eine ähnliche Situation wie bei der Synthese der Inhaltsstoffe von *Neurospora crassa* angetroffen würde: Die einzelnen Schritte sind von einzelnen Genen abhängig. Aber die Parallelität führt noch weiter, indem bei Kombination von Stämmen, die steril, aber phänotypisch verschieden sind, eine Kompensation der Defekte möglich ist. (Kompensation

nichtalleler Ernährungsdefekte im Heterokaryon, BEADLE und COONRADT 1944.) Die Analyse der dadurch möglichen Kreuzbarkeit wird im folgenden zunächst beschrieben werden. Bei diesen Kreuzungsanalysen wurde ein Phänomen beobachtet, das über die Befunde bei *Neurospora* hinausgeht: Aus dem Heterokaryon

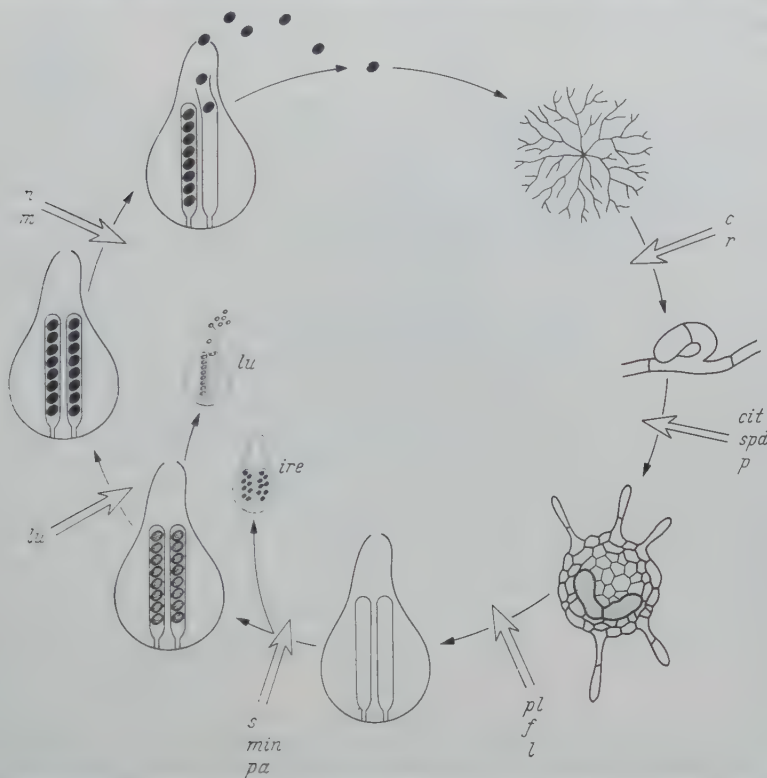


Abb. 3. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Sordaria macrospora*. Die von den Gensymbolen ausgehenden Pfeile geben an, nach welcher Entwicklungsstufe die Perithezienbildung bei den einzelnen Mutanten blockiert ist. Weitere Erläuterungen s. Text

entstehen auch Fruchtkörper, deren Asci nur *eine* Kernkomponente enthalten und die deshalb Selbstungsperithezien darstellen.

D. Genetische Untersuchungen

I. Die Kompensation genbedingter Defekte der Fruchtkörperentwicklung

Die Genmutanten wurden in den möglichen Kombinationen miteinander gekreuzt, wobei jeweils ein Kreuzungspartner mit einem Sporenfarb-Gen markiert war (*lu* oder *c*₁). Durch diese Versuchsanordnung war es möglich, Kreuzungsasci (4 schwarze, 4 Sporen mit Mutantenfarbe) und Selbstungsasci (8 schwarze bzw. 8 Mutantensporen) zu unterscheiden. Jede Kreuzung wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4 schematisch dargestellt.

Auf Grund dieser Versuche lassen sich die folgenden Aussagen machen:

1. *Alle Mutanten*, sowohl die selbstfertilen als auch die sterilen, sind mit Ausnahme der phänotypisch identischen Stämme (z.B. f_1, f_2, f_3) *miteinander*

fertil kreuzbar. Dies gilt auch für Mutanten, die in Einzelsporkultur keine Ascogone bilden (r , c_1 , c_2). In der Kontaktzone zweier Stämme entsteht entweder eine Linie von Perithezien (Abb. 5a) oder eine mehr oder minder breite Zone von

Stadien der Blockierung in der Fruchtkörperbildung																									
	c_1	c_2	r	cit	spd	p	pl	f_1	f_2	f_3	l_1	l_2	s_1	s_2	s_3	s_4	min	pa	n	ire	m	lu	cr	+	
	c_1	○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	c_2		○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	r			○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	cit				○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	spd					○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	p						○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	pl							○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	f_1								○	○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	f_2									○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	f_3										○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	l_1											○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	l_2												○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	s_1													○	○	○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	s_2														○	○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	s_3															○	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	s_4																○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	min																	○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	pa																		○	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	n																			⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	ire																				⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	m																					⊗	⊗	⊗	⊗
	lu																						⊗	⊗	⊗
	cr																							⊗	⊗
	+																								⊗

Abb. 4. Kreuzbarkeits-Test der Mutanten von *Sordaria macrospora*. Die Mutanten sind entsprechend ihrer Unterschiede im Entwicklungszyklus gruppiert. Es bedeutet: ⊗ kreuzbar, ○ nicht kreuzbar, ⊙ Mutante zu Selbstungsperithezien induzierbar

Fruchtkörpern, die sich über beide (Abb. 5b) oder einen der Kreuzungspartner ausdehnt (Abb. 5c).

Auch bei Verwendung von Mutanten der Perithezienform (cr , m) gleichen diese Kreuzungsperithezien im Habitus den Fruchtkörpern des Wildstammes. Sie enthalten Asci mit normalen Sporen, die bei der Reife ausgeschleudert werden.

2. Durch Tetradenanalyse konnte festgestellt werden, daß die Gene der miteinander kreuzbaren Mutanten keine Allele sind, denn in allen Kreuzungen

fanden wir neben Asci mit Parentaltypen auch Rekombinationsasci (4 Wildsporen/4 Sporen der Doppelmutter) und Tetratyp-Asci, die je 2 Sporen der Eltern- und Rekombinationstypen enthielten. Über das gegenseitige Verhältnis der Gene in phänotypisch identischen Stämmen (z. B. f_1, f_2, f_3) kann zunächst nichts ausgesagt werden, da sie nicht kreuzbar sind. Aber die Auswertung des Heterokaryontestes (s. S. 738) ließ auf Allelie innerhalb der Mutantengruppen c, i, f und l schließen.

3. Die sterilen Mutanten r, spd, f_1, f_2, f_3 sind in der Lage, in allen fruchtbaren Kreuzungen auch Selbstungsperithezien zu bilden. Die Mutante ire (Sporen im Ascus nicht linear angeordnet) zeigt in allen Kreuzungen neben Kreuzungsperithezien auch Selbstungsperithezien, deren Asci 8 ire -Sporen enthalten; sie sind linear angeordnet! Auf diese Erscheinung der Induktion soll im nächsten Kapitel eingegangen werden.

Es erhebt sich die Frage, auf welche Weise die Kreuzungsperithezien steriler Mutanten zustande kommen. Wie im ersten Kapitel nachgewiesen wurde, entwickeln sich die Ascogone apandrisch. In die Ascogone, aus denen Kreuzungsperithezien entstehen, müssen demnach die beiden genetisch verschiedenen Kerne vor der Ascogondifferenzierung eingewandert sein. Es liegt der Gedanke nahe, daß sich bei der Berührung der heterogenen Hyphen ein Heterokaryon bildet. In einem solchen Heterokaryon, das entweder durch Einwandern der einen Kernart in die Hyphen des Kreuzungspartners (die Querwände sind perforiert) oder durch Neubildung von Hyphen aus Anastomosen, die sehr häufig zu erkennen sind, entstehen kann, trägt jede Kernkomponente das Wildgen für den Defekt der anderen Kernart. Diese Annahme, nach der sich die genbedingten Defekte im Heterokaryon gegenseitig kompensieren, wurde durch den „Hyphen-spitzentest“ bestätigt.

Von einer 3 Tage alten Kreuzung zwischen den Mutanten f_1 (bildet Protoperithezien) und s_1 (bildet sterile Perithezien) wurden aus der Kontaktzone 40 etwa 1 mm³ große Agarblöckchen mit Myzel entnommen und auf einen 7%igen Wasseragar übertragen. Da auf diesem nährstoffarmen Medium nur ein sehr spärliches, wenig verzweigtes Myzel gebildet wird, konnten nach 24 Std von jeder Kultur je 5 1–3zellige Mycelspitzen isoliert werden. Diese übertrugen wir auf den normalerweise verwendeten Maisagar. Alle 200 Kulturen entwickelten sich zu Myzelien, die phänotypisch dem Wildstamm glichen, und bildeten zahlreiche Perithezien aus. Wie zu erwarten, entstanden neben den normalen Perithezien mit reifen Sporen auch sterile s_1 -Fruchtkörper, und zwar im Durchschnitt 20% (je Kultur wurden 10 Perithezien untersucht). Die genetische Analyse der normalen Perithezien zeigte die gleichen Ergebnisse wie die Kreuzung beider Mutanten. Es entstanden Kreuzungsasci und Selbstungsasci. Die 200 ausgesäten Hyphenspitzen waren also alle heterokaryotisch.

Die Kompensierbarkeit von Mutanteneigenschaften durch das Wildgen gilt allgemein. So bildet ein Heterokaryon aus 2 Mutanten (c_1 und r), die in Einzelkultur keine Ascogone aufweisen, zahlreiche Ascogone, die sich normal entwickeln; das Heterokaryon aus r und cit , die bei Einzelkultur verminderte Wachstumsgeschwindigkeit besitzen, wächst normal; alle Heterokaryen aus pigmentbildenden Mutanten (spd, l_1, l_2 usw.) sind wie der Wildstamm grau-weiß gefärbt; in jedem Heterokaryon mit $plum$ ist das typische fedrige Wachstum dieser Mutante verschwunden.

Es ist somit bewiesen, daß sterile Mutanten von *Sordaria macrospora* infolge einer Heterokaryonbildung fertile Kreuzungsperithezien bilden können. Durch die

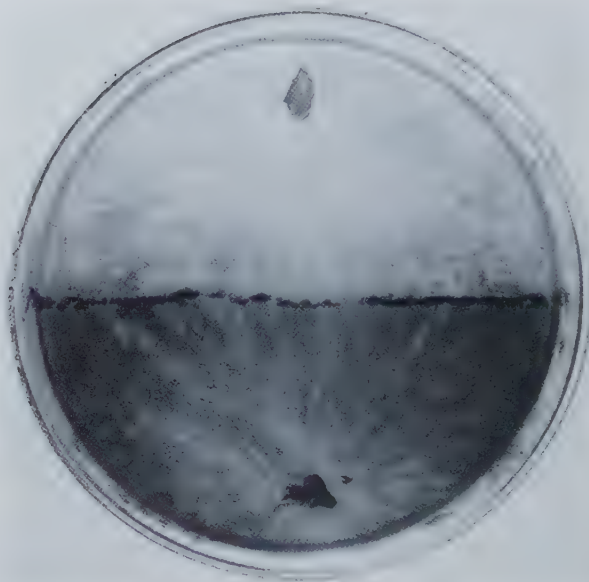


Abb. 5a. Kreuzungen zwischen sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora*. Die Perithezienbildung erfolgt: a nur in der Kontaktzone, Kreuzung $f_1 s_1 spd^+ \times f_1^+ s_1^+ spd$

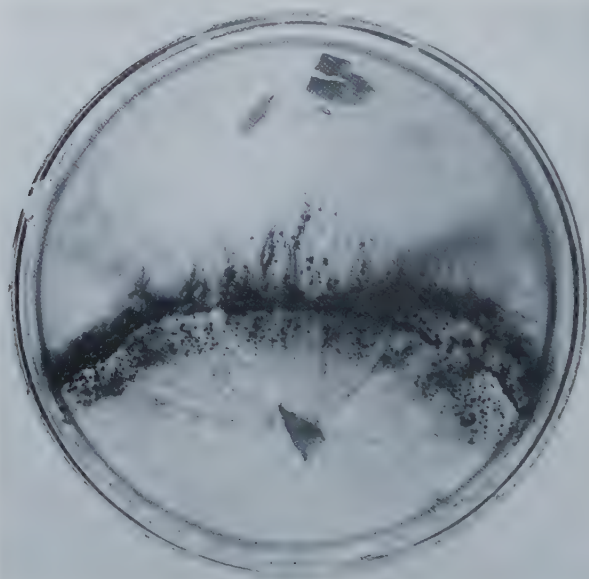


Abb. 5b auf beiden Mutanten, in der Kreuzung $f_1 s_1 c^+ \times f_1^+ s_1^+ c$

Kompensationswirkung der Wildgene ist das Heterokaryon befähigt, die einzelnen Defekte der mutierten Kerne zu überwinden und einen normalen Entwicklungszyklus zu vollziehen.

Bei Zwei- und Mehrfaktormutanten, die im Verlauf unserer Kreuzungsexperimente erhalten wurden, ist eine Kompensation infolge des Fehlens der entsprechenden Wildgene natürlich nicht möglich. Z. B. die farblose Mutante c_1 bildet keine Ascogone und die dunkelpigmentierte Mutante n nur normale Perithezien aus, deren Sporen nicht ausgeschleudert werden. Die Doppelmutante $c_1 n$ vereint die Eigenschaften beider Mutanten: sie ist dunkelpigmentiert und trägt keinerlei Geschlechtsdifferenzierungen.

Bei Kreuzungen von Mehrfaktormutanten können Defekte nur in dem Maße kompensiert werden, wie Wildgene vorhanden sind. So entstehen aus $s_1 f_1 c_1 \times s_1^+ f_1^+ c_1^+$ nur sterile Perithezien, da keiner der beiden Partner das Wildgen besitzt, das den Defekt von s_1 kompensieren könnte.

Nach Kenntnis der Kompensationswirkung nicht-alleler Wildgene läßt sich auch die Allelie der Gene gleicher Merkmalsausprägung mit Hilfe des Heterokaryontestes nachprüfen. In Analogie zu den bei *Neurospora crassa* bekannten Befunden (GARNJOBST 1953, 1955,

GARNJOBST und WILSON 1956) wäre es denkbar, daß die Nichtkreuzbarkeit dieser Stämme auf ihrer Unfähigkeit beruhen würde, Heterokaryen zu bilden. Diese Möglichkeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, da Heterokaryen unter

Anwendung der Hyphenspitzenmethode (s. S. 737) nachzuweisen waren, nachdem ein Kreuzungspartner durch das Farbgemisch *lu* markiert wurde.

II. Die Induktion normaler Fruchtkörperbildung bei Defektmutanten, besonders bei sterilen

Die Induktion von gesunden Fruchtkörpern aus sterilen Mutanten wurde zuerst bei der genetischen Analyse der Kreuzung $s_1f_1^+$ (sterile Perithezien) $\times$ $s_1^+f_1$ (Protoperithezien) beobachtet (ESSER und STRAUB 1956). Die Untersuchung von 164 Perithezien aus dieser Kreuzung ergab neben 29 sterilen $s_1f_1^+$ -Selbstungsperithezien noch 135 Fruchtkörper mit normalen Asci, die sich nach der Aussaat in die folgenden Typen unterteilen ließen:

1. 47 enthielten ausschließlich Asci, deren Sporen in Eltern- und Rekombinationstypen aufspalteten (Kreuzungsperithezien),

2. 31 besaßen ausschließlich Sporen vom Elterntyp $s_1^+f_1$ (Selbstungsperithezien),

3. 57 enthielten sowohl Kreuzungs- als auch Selbstungsasci (Mischperithezien). Selbstungsasci oder Selbstungsperithezien des Elterntyps $s_1f_1^+$ mit normalen Sporen wurden nicht gefunden.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse muß man von den beiden Tatsachen ausgehen, daß sich die Ascogone apandrisch zu Perithezien entwickeln, und daß bei Kreuzung von 2 Mutanten zunächst ein Heterokaryon entsteht. Durch die Kompensationswirkung der Gene s_1^+ und f_1^+ besitzt das Heterokaryon $s_1f_1^+ + s_1^+f_1$ die notwendigen Wildgene. Wenn beide Kernarten in ein Ascogon gelangen, entstehen naturgemäß Kreuzungsperithezien. Entgegen der Erwartung bilden Ascogone mit $s_1^+f_1$ -Kerne fertile Selbstungsperithezien, wenn sie im Heterokaryon liegen. Man muß daher annehmen, daß die Anwesenheit der $s_1f_1^+$ -Kerne in den Nachbaryphen dieser Ascogone genügt, um die Entwicklung von $s_1^+f_1$ -Ascogonen auch über das Stadium des Protoperitheziums hinaus bis zum normalen Perithezium zu ermöglichen. In diesem Sinne induzieren f_1^+ -Kerne im Heterokaryon die Perithezienbildung der sonst sterilen f_1 -Ascogone. Der Befund, daß nur die f_1 -Ascogone, nicht auch die s_1 -Ascogone, zur Bildung normaler Fruchtkörper induziert werden können, ist zunächst nicht erklärbar.



Abb. 5c auf einer Mutante (f_1), in der Kreuzung $f_1pl^+ \times f_1^+pl$ (Verkl. 1,3 $\times$)

Die Entstehung von Mischperithezien mit Selbstungs- und Kreuzungsasci läßt vermuten, daß die Ascogone mehr als 2 Initialkerne enthalten. Folgende Experimente bestätigten die Vermutung:

Aus dem Wildstamm (schwarze Sporen) und der Mutante *lu* (gelbe Sporenfarbe) stellten wir ein Heterokaryon $lu^+ + lu$ her. Dieses kreuzten wir mit der Mutante c_1 (keine Ascogonbildung, in Kreuzungen graue Sporenfarbe). Die in der Kontaktlinie zwischen dem Heterokaryon und c_1 entstehenden Kreuzungsperithezien wurden untersucht. Von 1026 Perithezien waren 790 Kreuzungsperithezien. Sie enthielten nur Asci von je einer der drei möglichen Kernkombinationen. (Selbstungsperithezien wurden nicht mitgezählt.) Die restlichen 236 Frucht-



Abb. 6. Asci eines Mischperitheziiums aus der Kreuzung des Heterokaryons $lu^+ + lu$ mit der Mutante c_1 . Die Initialkernpaare der Asci besaßen entweder die genetische Konstitution $c_1lu^+/c_1^+lu^+$ oder c_1lu^+/c_1^+lu . Der linke Pfeil (1) weist auf zwei Asci mit einer c_1^+/c_1 Aufspaltung hin. Der untere Ascus enthält 4 schwarze und 4 graue Sporen (c_1^+/c_1 ist präreduziert); der obere enthält 2 graue, 2 schwarze, 2 graue, 2 schwarze Sporen (c_1^+/c_1 ist postreduziert). Der rechte Pfeil (2) weist auf zwei Asci mit der bifaktoriellen Aufspaltung $c_1^+lu^+/c_1lu$ hin. Im oberen Ascus befinden sich 4 gelbe und 4 graue Sporen (Elterntyp; beide Genpaare präreduziert); im unteren Ascus sind 2 schwarze, 2 graue, 2 gelbe und 2 weiße enthalten (Tetratyp; c_1^+/c_1 ist postreduziert, lu^+/lu ist präreduziert)

körper waren Mischperithezien. Davon enthielten 214 Kreuzungsasci, die in schwarz/gelb aufspalteten, und daneben gelbe bzw. schwarze Selbstungsasci. Graue Selbstungsasci waren nicht zu erwarten, da c_1 niemals zur Bildung von Selbstungsasci induziert werden kann. Die restlichen 22 Perithezien besaßen neben Asci mit 4 grauen und 4 schwarzen Sporen auch Asci, deren Initialkerne c_1 und lu enthalten mußten. Die letzteren enthielten entweder vier graue und vier gelbe Sporen (Elterntyp) oder vier schwarze und vier weiße Sporen (Rekombinationstyp) oder je zwei schwarze, graue, gelbe und weiße Sporen (Tetratyp) (s. Abb. 6).

Damit ist bewiesen, daß die Ascogone von *Sordaria macrospora* mehr als zwei Initialkerne enthalten können. Der Inhalt der Mischperithezien spricht aber dafür (vgl. auch Tabelle 2 und 3), daß die Zahl der Kernpaare, die zu Beginn der Ascogonentwicklung vorliegen, höchstens zwei beträgt.

Das Vorhandensein von mehr als 2 Initialkernen ist für *Sordaria fimicola* und *Neurospora crassa* durch die Untersuchungen von GREIS (1941), OLIVE (1956) bzw. SANSOME (1947) bekannt.

Die Mutante f_1 ist nicht nur in der Kreuzung mit s_1 induzierbar, sondern auch in Kreuzungen mit allen anderen Mutanten. Die gleiche Eigenschaft zeigen

auch die beiden anderen Mutanten der f -Serie, f_2 bzw. f_3 (s. Abb. 4). Wie die folgenden Befunde zeigen werden, lassen sich auch Ascogone mit r - und spd -Kernen von allen anderen Mutanten induzieren. Infolgedessen entstehen bei den möglichen Kreuzungen der f -Serie mit spd - oder r -Stämmen Selbstungsperithezien beider Kerntypen (Abb. 4 und Tabelle 2).

Tabelle 2. Perithezientypen aus der Kreuzung der Mutante f_1 mit den Mutanten spd und r . In beiden Fällen war f_1 mit dem Gen lu (gelbe Sporenfarbe) markiert

Kreuzung	Anzahl	Kreuzungs- perithezien	Selbstungs- perithezien		Mischperithezien Selbstungsasci vom	
			Elter 1	Elter 2	Elter 1	Elter 2
$f_1 spd^+ \times f_1^+ spd$	263	82	160	5	11	5
$f_1 r^+ \times f_1^+ r$	219	41	140	12	23	3

Es ist auffallend, daß in beiden Kreuzungen nur 2 Typen von Mischperithezien beobachtet wurden, und zwar solche, die neben Kreuzungsasci nur Selbstungsasci vom einen oder anderen Elter enthielten. Die zu erwartenden Mischperithezien mit Selbstungsasci beider Eltern traten nicht auf. Auch finden sich keine Kreuzungsperithezien mit Selbstungen beider Elterntypen.

Die bisher dargestellten Induktionen normaler Perithezien aus Ascogonen, die nach ihrem Gengehalt steril sein müßten, werden dadurch charakterisiert, daß von den heterokaryotischen benachbarten Hyphen Wirkungen ausgehen, durch welche die zu erwartende Sistierung der Entwicklung überwunden wird. Die Induktion beschränkt sich jedoch nicht auf die Ausschaltung von Entwicklungshemmungen allein. Die selbstfertile Genmutante *ire* bildet Asci mit nicht linear angeordneten Sporen. Die Entwicklung der *ire*-Perithezien trägt sonst normalen

Tabelle 3. Perithezientypen aus der Kreuzung der Mutanten f_1 und *ire*. f_1 war mit dem Gen für gelbe Sporenfarbe (lu) markiert

Anzahl	Kreuzungs- perithezien	Selbstungsperithezien			Mischperithezien Selbstungsasci mit	
		f_1	<i>ire</i>		f_1	<i>ire</i>
			ungeordnet	linear		
75	33	10	15	10	2	5

Charakter. (Wir sehen hier von der Unfähigkeit Sporen auszuschleudern ab.) Kreuzt man *ire*-Stämme mit irgendeiner der anderen Mutanten oder mit dem Wildstamm, so treten neben Kreuzungsperithezien und Selbstungsperithezien mit *ire*-Charakter auch Selbstungsperithezien auf, die Asci mit *ire*⁺-Anordnung der Sporen besitzen (=linear angeordnet), obwohl alle Sporen *ire* enthalten. Ferner finden sich wieder 2 Typen von Mischperithezien (Tabelle 3).

Weitere Kreuzungen zwischen *ire*- und anderen Mutanten-Stämmen erbrachten die gleichen Ergebnisse. Sie beweisen, daß nicht nur Entwicklungsdefekte, sondern auch Entwicklungsanomalien durch Induktionswirkung des Heterokaryons aufgehoben werden können. Diese Befunde veranlaßten dazu, die Frage zu prüfen, ob die stoffliche Grundlage der Induktionswirkung faßbar ist.

III. Versuche zur Aufklärung des Induktionsmechanismus

Zu diesen Versuchen wurden die Mutanten f_1 und s_1 verwendet. Der Protoperithezien bildende Stamm f_1 wird durch den sterile Perithezien bildenden Stamm s_1 zur normalen Fruchtkörperbildung induziert.

Wir führten folgende Experimente unter Verwendung von flüssigen Nährmedien aus:

1. Filtrate verschieden alter Kulturen der Mutante s_1 wurden zu Kulturen von f_1 gegeben.
2. Extrakte von 4, 5 und 6 Tage alten s_1 -Myzelien gaben wir zu 2 und 3 Tage alten Kulturen von f_1 . Die Extrakte wurden durch Zerreiben der zwischen Filtrierpapier getrockneten Myzelien mit Quarzsand hergestellt. Vor der Zugabe wurden die Extrakte zentrifugiert und durch Filtration (Seitz) sterilisiert.

3. Beide Mutanten wurden in einem gemeinsamen Medium kultiviert, dabei aber durch eine Glasfritte (G 5 Schott & Gen.) oder eine Dialysiermembran (Kalle) oder ein Membranfilter (mit maximaler Porenweite von 400—500 m μ , Membranfilter AG, Göttingen) getrennt gehalten. Wir verwendeten dazu eine Glasröhre ($\varnothing$ 5 cm, Länge 20 cm), in deren Mitte die Fritte bzw. die Membran eingesetzt werden konnte. Die Enden der Röhre waren nach oben gebogen und während des Versuchs mit einem Wattestopfen verschlossen.

4. Ein Reagenzglas ($\varnothing$ 3,5 cm) wurde mit Nährlösung halb gefüllt und mit s_1 -Mycel beimpft. In dieses Glas tauchte ein mit der gleichen Nährlösung gefüllter Dialysierschlauch ($\varnothing$ 2 cm) bis fast zum Grunde ein; er war mit f_1 -Myzel beimpft. In mehreren Versuchen wurde auch reziprok beimpft.

Die Versuche Nr. 1 und 2 verliefen negativ, d. h., der f_1 -Stamm bildete keine Perithezien mit reifen Sporen. Bei den Experimenten Nr. 3 und 4 fanden wir in Einzelfällen wenige Perithezien mit f_1 -Sporen. Da aber auch in den Kontrollen einige „ f_1 -Perithezien“ gebildet wurden, ist der Einfluß der Kultur im synthetischen Medium nicht auszuschließen. Der f_1 -Stamm bildet auch auf Agar einzelne Perithezien, wenn das synthetische Medium statt des üblichen Maismehldekokts verwendet wird.

Es ist immer mißlich, aus negativen Ergebnissen Schlüsse ziehen zu müssen. Zusammenfassend können wir zunächst nicht mehr sagen, als daß eine Induktion durch Extrakte aus an sich zur Induktion fähigem Material nicht gelang, wobei mit den Möglichkeiten gerechnet werden muß, 1. daß das wirksame Agens nicht in den Extrakt gelangte, 2. daß es dort zerstört wurde oder 3. daß es nicht in die zu induzierenden Zellen gelangte. Für die Diffusionsversuche gilt sinngemäß dasselbe, und hier kommt noch hinzu, daß die gesuchten Stoffe, sollten sie aus dem Induktor hinaus und das zu Induzierende hineindiffundieren können, vielleicht die von uns verwendeten Membranen nicht passieren konnten.

E. Diskussion

Der monözische selbst-compatible Ascomycet *Sordaria macrospora* bildet seine Fruchtkörper apandrisch. Zwei Individuen können daher nur gekreuzt werden, wenn sich ein Heterokaryon aus beiden zu entwickeln vermag. Dies ist bei den hier verwendeten Stämmen offenbar immer der Fall. Pilzhyphen, die Kerne verschiedener Herkunft in sich vereinigen, entstehen durch zufälliges Fusionieren. Danach liegen die heterogenen Kerne in einem gemeinsamen Plasma. Wenn sich die beiden Kernarten dadurch unterscheiden, daß sie nicht-allele Gene tragen, welche bestimmte, voneinander verschiedene Defekte der Fruchtkörperbildung bewirken, so ist es verständlich, daß das Heterokaryon normale Perithezien bildet, denn die Defekte werden durch die Gegenwart der Wildgene aufgehoben. Zum Beispiel kann sich in dem Heterokaryon mit den Kernen $rspd^+$ und r^+spd weder der durch r bedingte Ausfall noch der von spd einstellen, da die allelen Wildgene, also spd^+ und r^+ , vorhanden sind. Defekte, die durch verschiedene Genwirkungen zustande kommen,

werden im Heterokaryon kompensiert. Was hier für Blockierungen in der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane und für morphologische Merkmale der Myzelien gezeigt wurde, ist bei *Neurospora crassa* an auxotrophen Mutanten bereits 1944 von BEADLE und COONRADT analysiert worden. Das Phänomen dürfte weit verbreitet sein. Sein Wesen kann als Symbiose aufgefaßt werden, wobei sich die Partner nur in Genen unterscheiden.

Auf Grund dieser genetisch fundierten Interpretation der Kreuzbarkeit steriler Stämme lassen sich die Befunde sinnvoll interpretieren, die GREIS (1941) an einer anderen *Sordaria*-Art machte. GREIS hatte bei *Sordaria fimicola* nach Röntgenbestrahlung eine große Zahl Steriler erhalten. Myzelien, die keine Ascogone ausbildeten, nannte er „Männchen“: solche, die Ascogone zeigten, aber keine Fruchtkörper zur Reife brachten, „Weibchen“. „Männchen“ und „Weibchen“ waren miteinander kreuzbar. In einigen Fällen waren auch „Weibchen“ und „Männchen“ unter sich kreuzbar. GREIS erklärte seine Befunde auf der Grundlage relativer Sexualität und schrieb den miteinander kreuzbaren „Männchen“ bzw. „Weibchen“ eine verschieden starke sexuelle Potenz zu. Diese Interpretation läßt sich nach den heutigen Kenntnissen der Tetradenanalyse unter Zuhilfenahme der Angaben von GREIS eindeutig widerlegen. Zwei Beispiele mögen genügen:

1. Bei Kreuzung eines struppigen, weißen Myzels („Männchen“) mit einem glatten, schwarzen („Weibchen“) findet GREIS in einem Tetratyp-Ascus neben den Eltern Nachkommen mit glattem, weißem, selbstfertilem Myzel und struppigem, schwarzem, sterilem ohne Ascogone. Er deutet die letzteren als „sekundären Zwitter“ bzw. „realisatorloses Myzel“. In Wirklichkeit muß es sich dabei um Wildstamm und Doppelmutante gehandelt haben.

2. GREIS fand nach Kreuzung eines Myzeliums, das zahlreiche Ascogone besaß, mit einem ascogonarmen in einem Ascus eine 1:1-Aufspaltung in beide Elterntypen. Das Zustandekommen dieser Kreuzungsperithezien hat mit relativer Sexualität, die GREIS zur Erklärung heranzieht, nichts zu tun. Sie ist vielmehr auf Heterokaryonbildung und die damit verbundene Kompensationswirkung zurückzuführen.

HÜTTIG (1935) glaubte die Kreuzbarkeit steriler Stämme der monözischen selbst-compatiblen *Glomerella lycopersici* mit fertilen Varianten auf relative Sexualität zurückführen zu können. Die Unhaltbarkeit dieser Vorstellung haben bereits WHEELER und seine Mitarbeiter in mehreren Untersuchungen (siehe zusammenfassende Darstellung bei WHEELER 1954) dargelegt. Sie konnten nachweisen, daß bei *Glomerella cingulata*, deren Ascogone von Antheridien befruchtet werden (McGAHAN und WHEELER, 1951), sterile Myzelien (Weibchen und Männchen) nur dann kreuzbar sind, wenn ihre Sexualdefekte durch nicht-allele Gene bedingt sind.

OLIVE (1956) führte seine Kreuzungsversuche wie GREIS an *Sordaria fimicola* aus, und zwar arbeitete er hauptsächlich mit Mutanten der Sporenfarbe. Daneben konnte er auch schwach fertile und völlig sterile Mutanten isolieren. Die sterilen waren mit allen fertilen Mutanten kreuzbar. OLIVE sieht die Grundlage der Kreuzbarkeit in einer „interaction between the two genotypes in a common cytoplasm“ nach erfolgter Heterokaryonbildung¹. Diese Interpretation stimmt mit unserer Erklärung, die das Wesen der Kreuzungsfertilität steriler Stämme monözischer selbst-compatibler Ascomyceten in der Kompensationswirkung sieht, völlig überein.

¹ Anmerkung bei der Korrektur: Siehe auch die sich zur Zeit im Druck befindenden Arbeiten von: CARR, A. J. H., and L. S. OLIVE: Genetics of *Sordaria fimicola*. III. Cross-compatibility among self-fertile and self-sterile cultures. Amer. J. Bot. HESLOT, H.: Contribution à l'étude cytogénétique des *Sordariacées*. Rev. Cytol. et Biol. vég. (1958).

Die Kompensierbarkeit heterogener Defekte ist nicht auf kernhaltige Organismen beschränkt. BENZER (1955) sowie ESSER, ERBEN und FÄHNICH (1957) konnten zeigen, daß sie ihre Wirkung auch nach Mischinfektion eines Bakteriums mit heterogenen Bakteriophagen entfaltet.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Bildung von normalen Perithezien aus sterilen Myzelien beschrieben, wobei alle Sporen eines Ascus das gleiche Sterilitätsgen tragen. Es handelt sich also um Selbstungsperithezien, die im Heterokaryon ausgelöst werden. Die Induktion der Selbstungsperithezien steriler Mutanten setzt voraus, daß sich Kerne in der Nähe befinden, die den Defekt der Mutanten kompensieren können. So bildet der Stamm *r* (Myzel ohne Ascogone) in Kreuzungen mit allen anderen Mutanten Ascogone, die sich zu Selbstungsperithezien entwickeln, indem der *r*⁺-Kern des jeweiligen Kreuzungspartners die *r*-Wirkung aufhebt, ohne selbst bei der Karyogamie beteiligt zu sein. Die Induktionserscheinung beruht also auf einer Kompensation, deren Wirkung über die Einzelzelle hinausgreift.

Naturgemäß erheben sich die Fragen nach dem Ort, von welchem die Induktion des kompensierenden Gens ausgeht, und dem Weg, den die Wirkung nimmt. Man könnte zunächst daran denken, daß sich die Induktion unmittelbar im Ascogon abspielt. Wenn etwa das Heterokaryon aus der Kreuzung von *f*⁺ mit *f* Ascogone bildete, deren Initialkernpaare *f*⁺+*f* und *f*+*f* enthielten — die Existenz von 2 Initialkernpaaren ist nachgewiesen (s. S. 740) — so würde der *f*⁺-Kern die Weiterentwicklung des *f*⁺-Paares ermöglichen. Gegen diese Vorstellung spricht aber das häufige Auftreten der Mischperithezien, in denen beide Initialkernpaare zur Entwicklung gelangen. Daher ist es wahrscheinlicher, daß die Induktionswirkung von den Kernen benachbarter Teile des Myzeliums ausgeht. Wenn man eine Vorstellung über die Art des Induktionsweges bilden will, so müssen die cytologischen Verhältnisse der Ascomyceten im Auge behalten werden. Bekanntlich ermöglicht die Perforation der Hyphenquerwände sowohl einen völligen Plasmaverband als auch unbehinderte Kernwanderungen. Damit sind die Voraussetzungen dafür gegeben, daß die Genwirkung auf kürzestem Wege und direkt über das Plasma an das Ascogon herangetragen werden kann. Es läßt sich nachweisen, daß eine Kernwanderung der Induktionswirkung vorangeht. Markiert man nämlich den induzierenden Kreuzungspartner mit dem Sporenfarb-Gen *lu* (gelbe Sporen), so befinden sich die Selbstungsperithezien in der Induktionszone (s. Abb. 5b) immer vermischt mit Kreuzungsperithezien. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß sich die Induktionswirkung nur über kleine Strecken ausbreitet.

Es ist bemerkenswert, daß die Kerne in bestimmten Kreuzungen von *Sordaria macrospora* nur in einer Richtung wandern (s. Abb. 5c). OLIVE (1956) hat diese Erscheinung bei *Sordaria fimicola* ausschließlich beobachtet. Hier tritt eine Unverträglichkeit von Plasmen und Kernen zutage.

Bei *Glomerella* sind Induktionserscheinungen durch WHEELER und MCGAHEN (1954) bekannt geworden, und der Nachweis diffundierbarer, induzierender Stoffe scheint dort gelungen zu sein. MARKERT (1949) kultivierte schwach kreuzbare Stämme von *Glomerella cingulata*, die durch eine Cellophanmembran von einem dritten Stamm getrennt waren, und beobachtete, daß sich die Kreuzungsfertilität der schwach kreuzbaren Stämme bei dieser Versuchsanordnung besserte. DRIVER und WHEELER (1955) konnten die Fruchtkörperbildung eines Stammes, der meist

nur sterile Perithezien entwickelte, durch Zugabe von Kulturfiltrat des Wildstammes erhöhen. Unsere Bemühungen, außerhalb der *Sordaria*-Hyphen Stoffe nachzuweisen, die die Fruchtkörperbildung steriler Stämme induzieren, waren erfolglos. Wir variierten die Versuchsanordnung vielfältig. Die in 2 Serien aufgetretenen Selbstungsperithezien bewiesen die Wirksamkeit extracellulärer Induktionsstoffe nicht, da sie auf das veränderte Kulturmedium zurückgeführt werden konnten. Wir möchten es für wahrscheinlich halten, daß die Induktionswirkung einen intracellulären, an das Plasma gebundenen Prozeß darstellt.

Auf Grund der bei *Glomerella* und *Sordaria* beobachteten Induktionswirkungen lassen sich mehrere experimentelle Befunde an monözischen selbst-compatiblen Pilzen erklären, deren Deutung bisher schwierig war. So können die von VÉZINA und RAPER (1957) bei *Aspergillus fonsaecus* gefundenen „präsumptiven Heterokaryen“ zwanglos durch Induktion erklärt werden. MAHONY und WILKIE (1958) fanden in Kreuzungen eines fertilen und eines sterilen Stammes von *Aspergillus nidulans* neben Kreuzungsperithezien auch Selbstungsperithezien der beiden Elterntypen und machten einen plasmatischen Faktor für ihr Auftreten verantwortlich. Nichts steht der Annahme im Wege, daß es sich um eine genbedingte Induktion handelt.

Wie bei der Kompensation im Heterokaryon darf man auch bei den Induktionserscheinungen darauf hinweisen, daß sie nicht auf karyotische Systeme beschränkt sind. STUBBE konnte (1958) bei *Oenothera* zeigen, daß die bleichen *Lamarckiana*-Plastiden ergrünen, wenn sie sich mit mutierten *suaveolens*-Plastiden im gleichen Gewebeverband befinden. Wahrscheinlich sind die plasmatisch bedingten Induktionen ebenfalls auf dem Wege über das Plasma wirksam.

Summary

1. Twenty-two gene mutants and one chromosomal aberration were isolated from X-ray treated material of the monoecious self-compatible ascomycete, *Sordaria macrospora* AUERSW. Of the gene mutants, eighteen are sterile, the development of their fruiting bodies being arrested at definitive stages. The four fertile mutants exhibit anomalous perithecial development. The majority of the genes act pleiotropically in so far as the mutants, in comparison with wild type, show alteration in mycelial morphology or in spore color also.

2. The sterile mutants can be crossed as long as non-allelic genes are responsible for their mutant phenotypes. The evolution of a heterocaryon from the hyphae of the participating strains forms the basis of this crossing ability. The defects of the two strains are compensated in the heterocaryon by the complementary actions of the wild type alleles of the mutant genes.

3. If one of the members of a cross is marked with a spore color mutant, it is possible to distinguish the self-fertilized perithecia which appear in crosses involving the wild type or fertile mutants. In crosses involving particular sterile mutants (for example *r*, *spd*, and *f*), completely fertile selfed perithecia also appear whose asci contain exclusively a single type of spore (either *r*, *spd*, or *f*). The mutant *ire*, whose ascospores are not arranged linearly, produces in crosses with all other mutants self-fertilized perithecia whose asci contain only *ire* spores, but in a linear arrangement. Finally, in that type of cross one finds mixed fruiting bodies which contain asci which derived both from heterocaryotic and from homocaryotic zygote nuclei. The self-fertilized perithecia, as well as the asci of homocaryotic origin, arise through induction. In this manner gene-determined defects are nullified by the extension of the compensatory action through the heterocaryon.

4. Agents which could diffuse into the medium and which might be accountable for the induction of self-fertilized perithecia could not be uncovered. Probably the induction is mediated through the cytoplasm.

5. The crossing ability of sterile mutants has previously been explained in terms of relative sexuality and the occurrence of self-fertilized perithecia has been attributed to plasmagenes. On the basis of the observations presented here, these results would seem naturally to follow as the consequence of compensation and induction in the heterocaryotic state.

Bei der Auslösung von Genmutanten und den entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen halfen die Lehramtskandidaten: Fr. E. ESSER, Fr. A. RADEMACHER und Herr K. M. LAUSBERG. Nacheinander unterstützten uns die technischen Assistentinnen: Fr. O. BURCHARD, Fr. M. KRÄMER, Fr. I. HANSEN und Fr. G. ROSE. Ihnen allen sei für ihre Mitarbeit gedankt.

Literatur

- BEADLE, G. W., and V. L. COONRADT: Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. Genetics **29**, 291—308 (1944). — BENZER, S.: Fine structure of a genetic region in bacteriophage. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **41**, 344—354 (1955). — CARR, A. J. H., and L. S. OLIVE: Genetics of *Sordaria fimicola*. II. Cytology. Amer. J. Bot. **45**, 142—150 (1958). — DANGEARD, P. A.: Recherches sur le developement du périthèce chez les ascomycetes. Botaniste **9—10** (1903/07). — DENGLE, I.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Sordaria macrospora* Auersw.. *S. uvicola* Viala et Mars. und *S. Brefeldii* Zopf. Jb. wiss. Bot. **84**, 427—448 (1937). — DRIVER, C. H., and H. E. WHEELER: A sexual hormone in *Glomerella*. Mycologia (N.Y.) **47**, 311—316 (1955). — ESSER, K.: Wachstum, Fruchtkörper- und Pigmentbildung von *Podospora anserina* in synthetischen Nährmedien. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **26**, 103—116 (1956). — ESSER, K., K. ERBEN u. P. FÄHNICH: UV-inaktivierte T4-Wildphagen induzieren die Reifung der Mutante T4 r 168 im Bakterium K 12 S (λ). Naturwiss. **44**, 68 (1957). — ESSER, K., u. J. STRAUB: Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora* Auersw. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 625—626 (1956). — GARNJOBST, L.: Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. **40**, 607—614 (1953). — Further analysis of genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. **42**, 444—448 (1955). — GARNJOBST, L., and J. F. WILSON: Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 613—618 (1956). — GREIS, H.: Mutations- und Isolationsversuche zur Beeinflussung des Geschlechts von *Sordaria fimicola* (Rob.). Z. Bot. **37**, 1—116 (1941). — HESLOT, H.: Contribution à la génétique de l'ascomycète homothallique *Sordaria macrospora* Auersw. Caryologia (Pisa) **6**, Suppl., 1115 bis 1117 (1953). — HÜTTIG, W.: Die Sexualität von *Glomerella lycopersici* Krüger und ihre Vererbung. Biol. Zbl. **55**, 74—83 (1935). — MAHONY, M., and D. WILKIE: An instance of cytoplasmic inheritance in *Aspergillus nidulans*. Proc. roy. Soc. B **148**, 359—361 (1958). — MARKERT, C. L.: Sexuality in the fungus *Glomerella*. Amer. Naturalist **83**, 227 bis 232 (1949). — McCLINTOCK, B.: *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. **32**, 671—678 (1945). — MCGAHEN, J. W., and H. E. WHEELER: Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. Amer. J. Bot. **38**, 610—617 (1951). — OLIVE, L. S.: Genetics of *Sordaria fimicola*. I. Ascospore color mutants. Amer. J. Bot. **43**, 97—107 (1956). — RIZET, G., et C. ENGELMANN: Contribution à l'étude génétique d'un ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. Rev. Cytol. et Biol. vég. **11**, 201—304 (1949). — SANSOME, E. R.: The use of heterocaryons to determine the origin of the ascogoneous nuclei in *Neurospora crassa*. Genetica **24**, 59—64 (1947). — STUBBE, W.: Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera*. II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. Z. Vererb.-Lehre **89**, 189—203 (1958). — VÉZINA, C., and K. B. RAPER: Presumptive heterocaryons in *Aspergillus fonsecaeus*. J. Bact. **74**, 396—408 (1957). — WHEELER, H. E.: Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. Phytopathology **44**, 342—345 (1954). — WHEELER, H. E., and J. W. MCGAHEN: Genetics of *Glomerella*. X. Genes affecting sexual reproduction. Amer. J. Bot. **39**, 110—119 (1952).

Aus der Forschungsstelle für Geschichte der Kulturpflanzen in der Max-Planck-Gesellschaft
in Berlin-Dahlem

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DIPLOIDEN *FRAGARIA*-ARTEN

I. Mitteilung

DIE KREUZUNG ZWISCHEN *FR. VESCA* UND *FR. NILGERRENSIS*, IHRE AUS-
WIRKUNG AUF DIE MORPHOLOGIE DER PFLANZEN UND DIE AUSBILDUNG
DES GESCHLECHTS

Von

URSULA NÜRNBERG-KRÜGER

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Mai 1956)

Einleitung

Die Untersuchungen der phylogenetischen Zusammenhänge der verschiedenen Arten der Gattung *Fragaria* zeigten, daß es sich hier um eine Polyploidenreihe mit der Grundzahl $n = 7$ handelt, in der Diploide bis Oktoploide vertreten sind. Allgemeines Interesse gewinnen die Experimente mit dieser Gattung durch die Tatsache, daß alle diploiden Arten zwittrig und alle polyploiden Arten diözisch sind, mit Ausnahme einiger sekundär wieder zwittrig gewordener Typen Nordamerikas. Die Bearbeiter dieser Fragen stellen an den entwicklungsgeschichtlichen Ursprung der Reihe die diploide *Fragaria vesca* L., zu der *Fragaria viridis* DUCH. als nahe verwandt angesehen wird. Die Arbeiten von LILIENFELD 1936 und SCHIEMANN 1937 mit diesen Arten legten nahe, die hexaploide *Fragaria moschata* als eine autopolyploide Form aufzufassen, deren Genome weitgehende Homologie zu dem von *Fragaria viridis* bzw. *vesca* zeigen. Das gleiche gilt nach Untersuchungen von STAUDT 1951/52 für die tetraploide *Fragaria orientalis*. Von *Fragaria vesca* und *Fragaria viridis* weicht nach SCHIEMANN 1951 und STAUDT 1951/52 der diploide Typus der asiatischen *Fragaria nilgerrensis* SCHLECHT. stark ab, deren Verbreitungsgebiet das der beiden anderen Arten nicht berührt. STAUDT 1951 nimmt an, daß diese Art im Gegensatz zu *Fr. vesca* und *Fr. viridis* an dem weiteren Aufbau der Mannigfaltigkeit der Gattung unbeteiligt blieb. SCHIEMANN vermutet — nach mündlicher Mitteilung als Arbeitshypothese — eine Beziehung auf Grund der Morphologie der vegetativen Organe zu der pazifisch-amerikanischen *Fr. chiloënsis*. Diese Hypothese wäre experimentell, evtl. über künstlich hergestellte Polyploide zu prüfen.

Die Frage ist, inwieweit sich diese in ihrer Morphologie sehr charakteristische diploide Art von der als Ausgangstypus angesehenen *vesca*-ähnlichen Ursprungsform entfernt hat. Gleichzeitig interessiert die Entstehung diözischer Formen aus der zwittrigen Ursprungsart und das Verhalten der diploiden Zwitter bei Kreuzungen in bezug auf die Ausbildung der Geschlechter. Darüber sollten zunächst die Kreuzungsanalysen der diploiden Arten untereinander Auskunft geben. Das unterschiedliche Gelingen der Kreuzungen und die Durchführung der weiteren Analysen führte dazu, daß als erste die Kreuzung *Fragaria vesca* × *nilgerrensis* näher untersucht werden konnte.

Experimenteller Teil

1941 gelang SCHIEMANN (unveröff.) die Kreuzung *Fragaria vesca* L. $\times$ *nilgerrensis* SCHLECHT. (Abb. 1). Die reziproke Kreuzung wurde 1951 von der



Abb. 1a—c. a *Fragaria vesca* L., b F_1 -Bastard $v \times n$, c *Fragaria nilgerrensis* Schlecht

Verfasserin erhalten. Die Kreuzbarkeit zeigte sich von den Umweltbedingungen abhängig; auch LILIENFELD 1936 gibt an, daß das Gelingen von Kreuzungen in verschiedenen Jahren schwankt. Über das verwendete Pflanzenmaterial gibt Tabelle 1 Auskunft. Die Charakteristika von *Fr. vesca* sind ausführlich bei STAUDT 1951/52 aufgezeigt. Eine kurze Diagnose von *Fr. nilgerrensis* findet sich bei LOSINA-LOSINSKAJA 1926, die Originaldiagnose bei SCHLECHTENDAHL 1857. Ihr Verbreitungsgebiet liegt in Ostindien, den Nilgery-Bergen, Kasyja, Himalaya, China: Yünnan, Hu-pei, Say-Tschuan und an der Westküste Vorderindiens.

A. Der F_1 -Bastard

$v \times n$. Die Kreuzung $v \times n$ ergab bei SCHIEMANN 1941 11 normal entwickelte intermediäre Pflanzen und 7 Zwerge, deren Auftreten durch die späteren Beobachtungen an Interesse gewann (vgl. S. 753). Sie kamen nur langsam zur Ausläuferbildung und haben zum größten Teil auch im Verlauf der Jahre nicht geblüht. Die Vermutung einer verminderten Chromosomenzahl bestätigte sich nicht. Die Ausgangssippen waren durch Selbstungen als genetisch rein erwiesen.

Die Wiederholung der Kreuzung 1951 ($n=11$) lieferte keine Zwerge. Die normalwüchsigen F_1 -Bastarde sind untereinander sehr einheitlich, neigen aber

phänotypisch im Laufe ihrer Entwicklung zeitweise mehr dem einen, zeitweise dem anderen Elter zu. Zu Einzelheiten s. Tabelle 1.

Die Antheren des Bastards waren klein, ähnlich denen der *Fr. vesca*, aber meist bräunlich verfärbt. Der reichlich gebildete Pollen war stets funktionsunfähig. Die Degeneration begann bald nach der Auflösung der Tetraden in Einzelzellen. In reifen Antheren waren die Pollenkörner geschrumpft, inhaltlos, die Exine war dick aufgequollen.

Die cytologischen Untersuchungen wurden nach der Karminessigsäure-Quetschmethode an Carnoy-2:1-Fixierungen durchgeführt. Die Reduktionsteilung der Pollenmutterzellen zeigte keine mechanische Ursache für die männliche Sterilität; diese muß ihren Grund in einer genischen Unstimmigkeit haben. Die Reduktionsteilung in den EMZ wurde nicht untersucht; sie dürfte auch normal verlaufen, da bei freiem Abblühen die Fertilität etwa 13% betrug. Bei besonders gut ausgebildeten Früchten erreichte sie 50%.

$n \times v$. Der Bastard *nilgerrensis* $\times$ *vesca* wurde 1951 mehrfach erhalten, allerdings mit zwei anderen *vesca*-Sippen. Die vegetative Entwicklung der $n \times v$ zeigte später große Neigung zur Bildung von Halbzwerge oder Zwergen. Der Pollen erschien wie bei $v \times n$ völlig funktionsunfähig. Auch waren weder selbstete noch freistehende Blüten noch künstlich bestäubte weiblich fertil. Ein Teil der Pflanzen war so winzig, daß von 1952—1955 gar keine Blüten gebildet wurden. Eine herabgesetzte Keimfähigkeit der Bastardnüsschen wurde trotz der gehemmten vegetativen Entwicklung der $n \times v$ nicht gefunden. Aus 155 $v \times n$ -Nüsschen wurden 52 Pflanzen = 33,5%, aus 213 $n \times v$ -Nüsschen 82 Pflanzen = 38,5% erhalten. Der Unterschied ist nicht signifikant.

B. Die Rückkreuzungen F_1R

I. Die Merkmale der vegetativen Phase

Die Rückkreuzungen konnten also nur mit dem Bastard $v \times n$ als Mutter gemacht werden. In beiden Kreuzungen wurde Ansatz erhalten. Die F_1R -Generation wurde in den Jahren 1949—1955 beobachtet. Zum Vergleich dienten jeweils Reinsaatn beider Elternarten.

a) *Die vegetative Entwicklung.* Die Keimkraft der Nüsschen aus der Rückkreuzung mit *vesca* (F_1Rv) war etwa doppelt so groß wie die der Rückkreuzung mit *nilgerrensis* (F_1Rn); sie reichte fast an die der reinen Arten heran.

	Anzahl der Nüsschen	Erhaltene Pflanzen	%
<i>vesca</i>			95—100
<i>nilg.</i>	90	84	93,3
$v \times n$	155	52	38,5
$n \times v$	213	82	33,5
F_1Rv	210	168	80,0
F_1Rn	171	79	46,2

Bei der Entwicklung der Keimpflanzen trat wieder ein gewisser Prozentsatz von Zwergen auf, wie es von den F_1 -Bastarden und auch aus anderen *Fragaria*-Kreuzungen bekannt ist. Bei diesen Pflanzen konnte es sich nicht um das Herausmendeln einzelner Gene handeln, weil fließende Übergänge auftraten von

Tabelle 1

Pflanzen- gruppe	1. Blattrosette	2. Laubcharakter	3. Ausläufer	4. Blütenstände
<i>Fragaria vesca</i>	etwa 30 cm hoch, buschig	kräftig grün, blank, Blättchen $\pm$ sit- zend, oval, groß, flach gerippt, Stiele mäßig behaart	reichlich, lang, sympodial ver- zweigt, hellgrün bis rötlich	reichblütig, straff aufrecht, weit das Laub überragend, hoch verzweigt
<i>Fragaria nilger- rensis</i>	flach	derb, dunkelgrün, Blättchen gestielt, rundlich, halb so groß wie <i>vesca</i> , tief gerippt, abstehend rötlich behaart	reichlich, kräftig, sympodial, ver- zweigt, dunkelrot	weniger reich- blütig, stark- stengelig, etwa in Laubhöhe, tief verzweigt
$F_1 v \times n$	intermediär, etwa 25 cm hoch, buschig dicht, z. T. Zwerge	intermediär	intermediär bis <i>vesca</i> -ähnlich	reichblütig, über das Laub ragend, unten verzweigt
$F_1 n \times v$	wie $F_1 v \times n$, später viel Zwerge mit dichten kleinen Ro- setten	wie $v \times n$	sehr spärlich	kaum geblüht
$F_1 R v$	alle Typen zwischen F_1 und <i>vesca</i> 5 Pflanzen $\sim$ <i>vesca</i> 7 Pflanzen $\sim$ F_1	wie Spalte 1 —————→	—————→	—————→
$F_1 R n$	vorwiegend <i>nilger- rensis</i> ähnlich mit Zwischentypen bis F_1	wie Spalte 1 —————→	—————→	—————→
$F_1 R_2 n$	stark <i>nilgerrensis</i> - ähnlich, sehr wüch- sig	wie Spalte 1 —————→	—————→	—————→

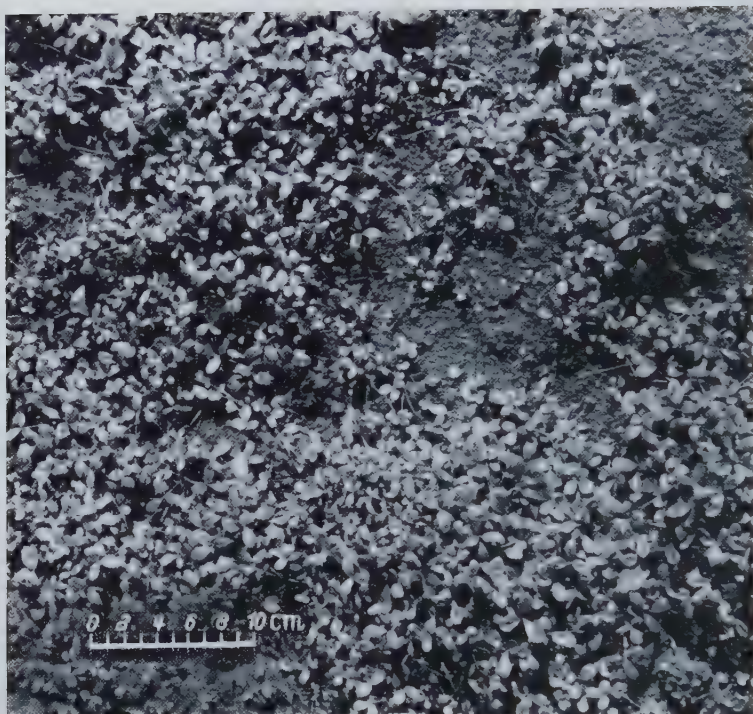
nichtkeimenden Nüßchen über verkümmernde Keimlinge und winzige Zwerge, Halbzwerge (SCHIEMANN 1931), bis zu den normalwüchsigen Pflanzen. Die vegetative Entwicklung und Leistungsfähigkeit schien je nach den in die *Fr. vesca* hineingelagerten Chromosomen von *Fr. nilgerrensis* verschieden zu sein. Die Zwerge bildeten fast ausnahmslos einen kleinen Stamm und konnten völlig ohne Ausläufer bleiben. Später erschienen sie als ein dichtes, breites, niedriges Polster (Abb. 2), oder sie gingen langsam zur Entwicklung längerer bis schließlich normaler Ausläufer über. Alle Typen von Zwergpflanzen und Halbzwerge traten in beiden Rückkreuzungen auf. Offenbar bewirken artfremde Gene Störungen

Tabelle 1

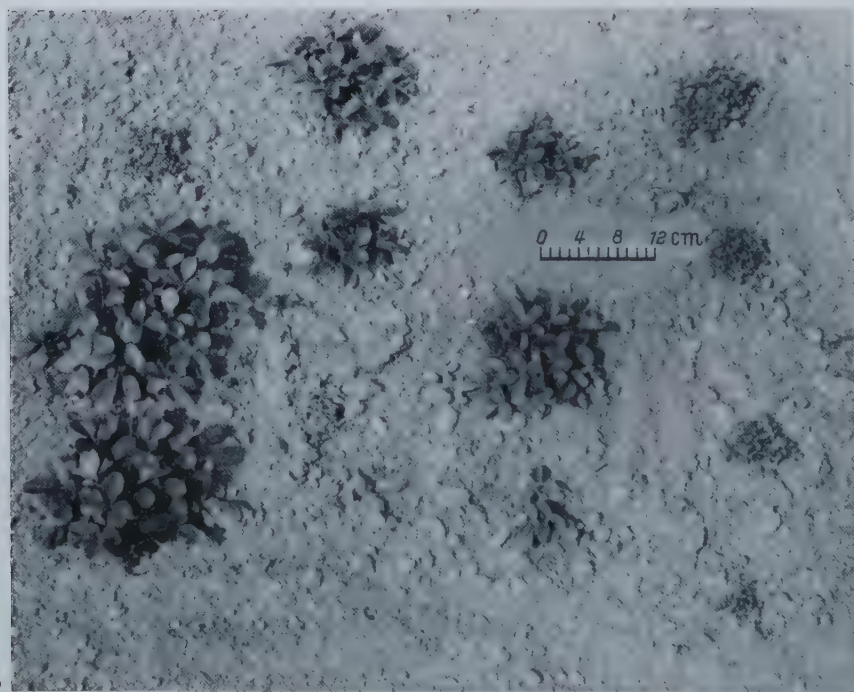
5. Blüten	6. Scheinbeeren	7. Entwicklungs- ablauf	8. Herkunft
16,1 mm mit runden Kronblättern, die sich berühren oder schwach überstehen, Kelch überragt nicht	leuchtend rot, viele oberflächlich sitzende dunkle Nüßchen, rund bis konisch, Walderdbeergeschmack, Kelch abstehend	blüht im 1. Jahr, stirbt dann häufig ab	Si 4 aus Botanischem Garten Straßburg, seit 1919 als reine Linie bei SCHIEMANN
16,9 mm, ziemlich groß, Kronblätter mit Abstand voneinander, Kelch stark behaart, überragt die Kronblätter	weiß, kleine, schwach eingesenkte helle Nüßchen, flachrund, wäbzig, Geschmack bananenähnlich, Kelch schwach anliegend	blüht im 2. Jahr, sehr langlebig, gesund	Si Likiang aus Botanischem Garten Uppsala, Si Muli Kulu, Coll. Smith, aus Yünnan, seit 1937 bei SCHIEMANN als reine Linie
15 mm, kleine runde Kronblättchen, berühren sich fast, häufig Vermehrung der Kronblätter, Kelch intermediär, überragend	ähnlich nilgerrensis, schlecht ausgebildet, schmutzig rosa, nur halb fertil, häufig mit Hals, schwach eingesenkte dunkle Nüßchen, Kelch schwach anliegend	intermediär, blüht spät im 1. Jahr oder Anfang des 2. Jahres, langlebig	1941 Kreuzung SCHIEMANN, unveröffentlicht. Aussaat 1942
wie v × n	keine	zum großen Teil nach 4 Jahren noch nicht geblüht	Kreuzung 1951 mit vesca Si 853 aus Marburg und vesca Gries (Sort. SCHIE.), beide als reine Linien gezogen
— — —	wie vesca ± fertil	streut von Pflanzen mit Blüten im 1. Jahr bis zu Pflanzen, die im 4. Jahr noch nicht geblüht haben	Kreuzung 1949
— — —	sehr kümmerlich, z. T. weißfrüchtig, Nüßchen grün oder rot	streut von Pflanzen mit Blüten nach dem 2. Jahr bis zu Pflanzen, die nach 4 Jahren noch nicht blühten	Kreuzung 1949
— — —	sehr kümmerlich, z. T. weißfrüchtig, Nüßchen grün oder rot	wie F ₁ Rn	Kreuzung 1951

der physiologischen Abläufe. Der Zwergcharakter einer Pflanze entscheidet aber nicht über ihre Verbreitungsfähigkeit, ihre Lebensdauer und ihre Blühwilligkeit.

Entsprechend dem Entwicklungsrhythmus der Eltern hat in F_1Rv ein Teil der Pflanzen im ersten Jahr geblüht, in F_1Rn keine einzige; doch standen ihre Pflanzen vegetativ sehr üppig. Während die F_1Rv schon nach 1 Jahr einen lückigen Bestand zeigte, war der Bestand der F_1Rn voll und die Anfälligkeit für Schädlinge und Krankheiten gering. (Der F_1 -Bastard nahm auch hier eine mittlere Stellung ein.)



a



b

Abb. 2a u. b. a Zwerggrasen einer Pflanze aus $F_1 R_v$, b Größenverhältnisse von einjährigen Pflanzen aus $F_1 R_n$

b) *Wuchstypus*. In der Zeit von der Aussaat am 20. 7. 49 bis zum 2. 8. 50 wurden 4 Feldbonitierungen durchgeführt. Bei der letzten waren alle Pflanzen vegetativ voll ausgewachsen. Die reinen *vesca* zeigten bereits eine vegetative Degeneration. Aus dieser Habitusbeurteilung scheiden alle als Zwerge bezeichneten Pflanzen aus, weil ihr Phänotypus dem der Ausgangsarten nicht zu vergleichen ist. Von ihnen wird später zu sprechen sein.

Für die F_1Rv ergab sich erwartungsgemäß ein Überwiegen *vesca*-ähnlicher Charaktere im Gesamtbild der Nachkommenschaft ($n = 166$). *Nilgerrensis*-ähnliche Typen wurden nicht gefunden. Schon der F_1 -Bastard zeigte häufig eine Dominanz der *vesca*-Charaktere. Doch zeigten einige Pflanzen ähnlich wie die F_1 (vgl. S. 749) während bestimmter Stadien eine Annäherung an *nilgerrensis*. Unter diesen waren etwa gleich viel schwache wie kräftige Keimpflanzen; ein Einfluß der Gesamtwüchsigkeit auf die Penetranz einzelner Merkmale war also nicht festzustellen.

Läßt man den Stückaustausch bei der Meiose unberücksichtigt, so müßte man bei $2n - 14$ in der Rückkreuzung eine Pflanze auf 128 erwarten, die ein homozygoten, vollständiges *vesca*-Genom enthält. Bei einem $P < 0,01$ für das Auftreten eines solchen Individuums in der Nachkommenschaft ist anzunehmen, daß in einigen der fünf als *vesca*-gleich bonitierten Pflanzen noch einzelne *nilgerrensis*-Elemente enthalten waren.

Die genetischen Kombinationen der Rückkreuzung führten auch zu völlig abweichenden Phänotypen, die an andere Arten der Gattung erinnern, so an *Fr. moschata* oder an die von SCHIEMANN 1937 als „Neuer Typ“ beschriebene Form, Phänänderungen auf Grund quantitativer Verschiebungen im Genmaterial.

Ob das *vesca*-Plasma wirksam ist — etwa so, daß der Habitus insgesamt stärker in Richtung auf *vesca* verschoben wird —, läßt sich in dieser Rückkreuzung nicht entscheiden.

Die F_1Rn ($n = 77$) enthielt wieder eine größere Anzahl Zwerge. Von den Normalwüchsigen zeigten die meisten einen häufig auch während der Entwicklung wenig variierenden *nilgerrensis*-ähnlichen Typus. Nur 19 Pflanzen waren in allen Bonitierungen als *nilgerrensis*-Typus registriert worden, andere sahen vorübergehend der F_1 ähnlich. Auch in dieser Reihe wurden *moschata*-ähnliche Formen gefunden. Im Herbst 1950 waren noch 5 Pflanzen als F_1 -ähnlich beschrieben; stärker *vesca*-ähnliche als F_1 nach voller Entwicklung wurden erwartungsgemäß nicht beobachtet. Das gehäufte Auftreten sehr *nilgerrensis*-artiger Formen in diesen Nachkommenchaften spricht gegen eine deutliche Auswirkung des Plasmons auf den Habitus.

c) *Die Zwergtypen*. Von Bedeutung scheint das Plasma bei der in den Rückkreuzungen häufigen Zwergbildung zu sein.

(Diese ist grundsätzlich zu unterscheiden von der in F_1Rv ebenso wie bei älteren *vesca*-Pflanzen häufigen Verzweigung infolge von Milben- oder Virusbefall.)

In F_1Rv liegt die Ausbildung der Zwergformen nicht von der Keimpflanze an fest und zeigt ein sehr variables Bild.

Typus der Keimpflanzen (15. September 1949)		Typus der ausgewachsenen Pflanzen (2. August 1950)	
F_1Rv	15 Zwerge	2 Zwerge	} ab November 1949
		13 Normalwüchsige	
	151 Normalwüchsige	15 Zwerge	} ab November 1949
		16 Zwerge mit Schwankungen bis zu Halbzwerge	
		16 Pflanzen mit rhythmischem Wechsel (Frühjahr normal, Herbst zwergig)	
		104 Normalwüchsige	
F_1Rn	33 Zwerge	33 Zwerge	} Frühjahr 1950
	44 Normalwüchsige	44 Normalwüchsige	

Gleichbleibender waren die Verhältnisse in F_1Rn , deren Zwergpflanzen im großen ganzen vom gleichen Typus waren wie in F_1Rv , Z. T. aber auch einen extremeren Charakter trugen. Ein Teil fiel vor Abschluß der Bonitierungen aus, so daß im August 1950 von insgesamt 59 noch lebenden Pflanzen 18 Zwerge waren (etwa 30 % gegen 43 % zu Beginn). Im Laufe des Jahres waren also mehr Zwerge eingegangen als normalwüchsige Pflanzen. Die überlebenden Pflanzen der F_1Rn waren alle robuster und wüchsiger als die der F_1Rv .

d) *Ausläuferbildung*. Die für den Wuchstypus charakteristischen Ausläufer werden von beiden an der Kreuzung beteiligten Elternarten reichlich und kräftig angelegt, von *Fr. nilgerrensis* entsprechend der im ganzen langsameren Entwicklung später als bei *Fr. vesca*. In den F_1R spalteten Typen heraus, die erst später oder selbst noch bis zum Herbst 1950 keine Ausläufer bildeten.

Tabelle 2. Prozentsatz der Pflanzen mit Ausläufern

	15. 9. 49	27. 9. 49	9. 11. 49	20. 4. 50	5. 5. 50	2. 8. 50
Pv	beginnt	70,0%		100,0%		
Pn	0,0%	0,0%		100,0%		
F_1	beginnt			100,0%		
F_1Rv	45,5%	75,0%	63,2%	81,2%	81,2%	91,8%
F_1Rn	9,1%	41,5%	49,3%	63,2%	64,3%	70,0%

Der Rhythmus der Ausläuferbildung war bei den einzelnen Pflanzen verschieden. Es kann daher vorkommen, daß an einem späteren Bonitierungstermin Pflanzen ohne Ausläufer gefunden wurden, die früher schon welche gebildet hatten, dann aber abgerankt worden waren (s. 9. 11. 49).

Eine Beziehung zwischen fehlender Ausläuferbildung und Zwergenwuchs war in der F_1Rn deutlich. Von 33 Zwergpflanzen sind im Herbst 1950 nur bei einer Ausläufer festgestellt worden, ebenso bei einem der Halbzwerge. Die vegetative Zuwachsleistung war also bei den Zwergen stark herabgesetzt. Von den normalwüchsigen Pflanzen ist dagegen nur eine, die schon im Frühjahr 1950 einging, ohne Ausläufer geblieben.

In der F_1Rv kamen Zwergpflanzen mit und ohne Ausläufer vor. 42 Pflanzen zeigten im Zwergstadium keine Ausläuferbildung, 25 Pflanzen jedoch völlig normale vegetative Vermehrung und führten so zu kleinen Rasen, die nicht mehr *fragaria*-ähnlich erschienen. Die wuchshemmende Wirkung bestimmter Kombinationen des *nilgerrensis*-Genoms mit einzelnen *vesca*-Chromosomen kam also im v-Plasma der Rückkreuzungen deutlich stärker zum Ausdruck als die einzelner *nilgerrensis*-Chromosomen im *vesca*-Genom.

e) *Anthocyanbildung*. Bei den einzelnen Pflanzen variieren die Ausläufer in Behaarung, Dicke, Verzweigung und der Ausfärbung mit Anthocyan.

	Dunkelrote Ausläufer	Hellrote Ausläufer	Grüne Ausläufer	
F_1Rv a)	19 = 54,3%	14 = 40,0%	2 = 5,7%	} 27. 9. 49
F_1Rn b)	3 = 75,0%	1 = 25,0%	— = 0,0%	
	22 = 51,4%	15 = 38,5%	2 = 5,1%	} 9. 11. 49
a)	11 = 47,8%	8 = 34,8%	4 = 17,4%	
b)	16 = 64,0%	6 = 24,8%	3 = 12,0%	
	27 = 56,2%	14 = 29,2%	7 = 14,6%	
a)	— = 0,0%	1 = 25,0%	3 = 75,0%	} 20. 4. 50
b)	4 = 66,8%	— = 0,0%	2 = 33,2%	
	4 = 40,0%	1 = 10,0%	5 = 50,0%	

In der $F_1 Rv$ ergab sich ein Verhältnis von 19 dunkelrot:16 hellrot + grün, annähernd ein 1:1-Verhältnis, das sich auch durch die erst später hinzukommenden 23 bzw. 4 Pflanzen nicht ändert.

In $F_1 Rn$ herrschten Pflanzen mit dunkelroten Ausläufern vor, grünrankige Pflanzen fehlten zunächst. Unter den späten Ausläuferbildnern waren überwiegend dunkelrote Formen (3:1 bzw. 19:10 bzw. 23:12). Ein einfaches Spaltungsverhältnis liegt wohl nicht vor (diese Daten können nur als Voruntersuchung für eine weitere Faktorenanalyse gewertet werden. Sie deuten aber auf die Wirksamkeit eines Hauptgenes hin mit modifizierenden Nebengenen).

Es wurde versucht, die Farbstoffverteilung auch in den Blattstengeln zu erfassen. *Nilgerrensis* und *vesca* zeigen rot ausgefärbte Stengel und Blütenstandsstengel, bei *nilgerrensis* ist die Färbung tiefer. F_1 hatte dagegen grüne Stengel, völlig ohne Anthocyan.

Die Kreuzungen zeigten folgende Spaltung:

	Anthocyan		
	stark	vorhanden	fehlend
$F_1 Rv$	12	:	53
$F_1 Rn$	9	:	6
		:	42

Man kann 2 komplementäre Anlagenkomplexe bei den Arten annehmen, da sich im Bastard die Ausfärbung nicht zeigt, wobei das Plasma die Gene der fremden Art nur in homozygotem Zustand zur Wirkung gelangen läßt. Dann ergäbe sich in der Rückkreuzung mit dem Elter, von dem das Plasma stammt, 2 Hauptfaktoren angenommen, eine Aufspaltung von 1:1, in der anderen Richtung 3 ungefärbt zu 1 gefärbt.

f) *Beerenfarbe*. Einen einfachen Erbgang zeigt die Farbe der Scheinbeeren:

	Dunkelrot	Hellrot	Schmutzigrot	Rosa	Weißlichrosa	Weiß
Pv	—	—				
Pn						+
$r \times n$				+		
$F_1 Rr$	20	36	4	3	0	0
$F_1 Rn$	0	0	0	1	4	2

Beim Bastard $n \times r$ wurden bisher keine Scheinbeeren gebildet. In der $F_1 Rn$ war ihre Farbe schlecht zu beurteilen, weil sie infolge der geringen weiblichen Fertilität kümmerlich ausgebildet wurden. In späteren Jahren waren die meisten schmutzigrosa bis weißlich. Häufig waren die Fruchtböden trocken, nicht fleischig ausgebildet. Danach liegt ein einfach mendelnder Erbgang vor mit stärkerer Penetranz des Rotfaktors.

g) *Blattgröße*. Für die Messung der Blattstiellänge und der Länge des Stielchens am Mittelblatt wurden im Sommer je Pflanze 3 normal entwickelte Laubblätter abgenommen und gepreßt. Als Maß für die Größe der Laubblätter diente die Länge des Mittelblättchens.

Die Blattgröße zeigte wie andere quantitative Merkmale in F_1 das geometrische Mittel der beiden Elternwerte.

<i>vesca</i>	M = 5,35 cm	geometrisches Mittel aus $P_1 + P_2 = 4,56$ cm
<i>nilgerr.</i>	M = 3,85 cm	arithmetisches Mittel aus $P_1 + P_2 = 4,68$ cm
$F_1 v \times n$	M = 4,58 cm	
$F_1 Rv$	M = $4,22 \pm 0,084$ cm	
$F_1 Rn$	M = $2,88 \pm 0,205$ cm	

Die Streuung in den Rückkreuzungen war erheblich (Abb. 3). Obwohl in F_1Rv im Höchstfalle nur gleich viele *nilgerrensis*-Chromosomen vorhanden sind wie bei F_1 , scheint die verkleinernde Wirkung der *nilgerrensis*-Faktoren bei gestörtem Chromosomengleichgewicht sehr stark.



Abb. 3a—l. Blatttypen von a *vesca*, b *nilg.*, c $F_1v \times n$, d—f F_1Rv , g—l F_1Rn

h) *Blattform* (Abb. 3). Charakteristisch für das *nilgerrensis*-Blatt ist das langgestielte Mittelblättchen.

<i>vesca</i>	M=2,0 mm	} geometrisches Mittel 4,36 mm arithmetisches Mittel 5,75 mm
<i>nilgerr.</i>	M=9,5 mm	
$F_1v \times n$	M=4,0 ± 0,15 mm	
F_1Rv	M=3,38 mm	
F_1Rn	M=4,00 mm	

Die Streuungskurve der F_1Rn zeigt eine erhebliche Breite. Bei der Kleinheit der Blätter fällt die Stielchenlänge prozentual zur Blattgröße stark ins Gewicht,

übt also auf den Blatttypus einen erheblichen Einfluß aus. Der Blattecharakter neigte im allgemeinen stärker zu *nilgerrensis*. Dieser Eindruck wurde auch durch die dunklere Laubfärbung und die derbe Blattaderung verstärkt.

Die Form des Blattes ist durch das Längen-Breiten-Verhältnis des Mittelblättchens bestimmt. Die Seitenblättchen wurden wegen ihrer Asymmetrie bei den Messungen nicht berücksichtigt. Der runde Typus des *nilgerrensis*-Blattes erweise sich als erheblich schwächer gegenüber dem *vesca*-Element; nur Typen mit vermutlich vorwiegend *nilgerrensis*-Genen zeigten das runde Blatt. (Tabelle 3 gibt die Mittelwerte dieser und der folgenden Messungen.)

Tabelle 3

	Blattindex	Längen der Blattstiele in cm	Höhe der Blütenstände in cm	Überragen über dem Laub in cm	Blütengröße in mm	Frucht- bodenbreite in mm
<i>vesca</i>	1,40	$5,29 \pm 0,99$	17,3	+ 12,0	16,13	3,25
<i>nilger.</i>	1,00	$3,05 \pm 0,85$	10,0	+ 6,95	16,9	3,5
$F_1 v \times n$	$1,44 \pm 0,051$	$6,85 \pm 0,65$	13,4	+ 6,55	$15,44 \pm 0,34$	4,13
$F_1 R v$	$1,46 \pm 0,014$	$4,79 \pm 0,17$	$6,9 \pm 0,44$	+ 2,11	$12,48 \pm 0,31$	2,94
$F_1 R n$	$1,32 \pm 0,023$	$3,05 \pm 0,21$	$6,9 \pm 0,45$	+ 3,83	$14,19 \pm 0,51$	3,65

i) *Pflanzenhöhe*. Maßstab der Pflanzengröße war neben dem Laub die Länge der Blattstiele. Beide Rückkreuzungen zeigten eine positive Korrelation der Pflanzenhöhe zur Größe des Laubes. Der Bravaisische Koeffizient $r = +0,75$.

Eine Beziehung zwischen der Pflanzenhöhe und dem Habitus war nicht zu finden. Zwar hatten die Zwergpflanzen in jeder $F_1 R$ im Mittel kürzere Blattstiele als die Gesamtnachkommenschaften — bei $F_1 R n$ 2,26 cm und bei $F_1 R v$ 3,18 cm — aber die Werte der F_1 -ähnlichen, *vesca*-ähnlichen oder wechselnden Typen sind nicht deutlich unterschieden, sondern streuen um ähnliche Mittelwerte. Die Einstufung der Pflanzen in die einzelnen Klassen wird wenig von der Stiellänge beeinflusst.

Das Verhältnis der Blütenstandsstiele zu den Blattstielen gab ein Maß für den Charakter der blühenden und fruchtenden Pflanze. Der Korrelationskoeffizient für die Höhenmeßwerte beträgt $\pm 0,322$; die Höhe des Überragens der Blütenstände über das Laub variierte innerhalb der Nachkommenschaften beträchtlich (4. Spalte, Tabelle 3). Die Variationsbreite der $F_1 R v$ reicht von 11,0 cm über dem Laub bis zu 5,2 cm unter dem Laub ($\sigma = 3,6$); bei $F_1 R n$ von 8,5 cm über bis zu 1,3 cm unter dem Laub ($\sigma = 2,5$). Ein Übersteigen der F_1 -Höhe könnte durch das Zusammenkommen zweier bestimmter homologer *nilgerrensis*-Chromosomen bewirkt sein.

Alle Zahlen, die sich auf die Bildung von Blüten und Fruchständen beziehen, wurden im ersten Jahr gewonnen, in dem die Pflanze blühte. Zählungen und Messungen wurden nur an den stets gleichmäßig kultivierten und abgerankten Hauptpflanzen durchgeführt, weil Klonpflanzen sich ganz anders entwickeln können, je nach dem Zeitpunkt ihrer Vermehrung, den Kulturbedingungen, dem Alter usw., vor allem in bezug auf den Beginn der generativen Reife. Einzig zur Beurteilung der Geschlechtsausbildung der Blüten wurden die Klone mit herangezogen.

II. Die Merkmale der generativen Phase

1. Blütenmorphologische Merkmale (Tabelle 3, Spalte 6/7). a) *Blütengröße*. Abb. 4 zeigt Blüten der Elternarten und des Bastards. In beiden F_1R kamen Typen vor, die großblütiger waren als die der reinen Arten (Tabelle 3). Dieser Unterschied beruht auf einer Differenz der Kronblattgrößen, verbunden mit einem Unterschied in der Größe der Fruchtböden (Breite), der indessen mit 3,5 mm bei *nilg.* und 3,25 mm bei *vesca* nicht gesichert ist. Der Bastard zeigte bei geringerer Blütengröße einen vergrößerten Fruchtboden und kleinere Kronblätter, wodurch die Blüte unscheinbar wird. Die Zahl der Samenanlagen ist davon unabhängig.



Abb. 4. Blüten: links *vesca*, rechts *nilg.*, Mitte $F_1 v \times n$

b) *Kronblattstellung*. Die Stellung der Kronblätter war bei F_1 intermediär zwischen der von *vesca*, deren Kronblätter sich berühren, und der von *nilgerrensis*, für die ein breiter Abstand typisch ist, der den kräftig ausgebildeten Kelch durchblicken läßt (Abb. 4).

	Kronblatt- stellung	Kronblattindex		
		unter 1	über 1	gleich 1
$F_1 Rv$	00	12	—	2
	0 0	12	—	2
	0 0	11	8	12
$F_1 Rn$	00	1	—	—
	0 0	5	1	—
	0 0	4	2	5

c) *Kronblattform*. Mit der Kronblattstellung korreliert ist die Form der Kronblättchen. Kronblättchen mit länglich-schmaler Form zeigen fast ausschließlich die offene Stellung und berühren sich nicht, während die, deren Index kleiner als 1 ist, sich häufiger berühren oder überdecken.

Kronblattindex:	<i>Fr. nilg.</i>	1,00
	<i>Fr. vesca</i>	0,98
	F_1 . . .	1,05 $n = 60$
	$F_1 Rv$. .	0,95 $\pm 0,0224$
	$F_1 Rn$. .	0,936 $\pm 0,0243$

d) *Kelchbildung*. Auch die Ausbildung des Kelches erhält durch das Einkreuzen eines anderen Genoms eine größere Variabilität. Der Kelch ist bei *nilgerrensis* bedeutend größer und, wie das gesamte Laub, sehr stark behaart.

In beiden Rückkreuzungen traten neue Typen auf mit verschieden starker Ausbildung von Innen- und Außenkelch und z. T. stark geschlitzten Zipfeln. In $F_1 Rn$ setzte sich die starke rötliche Behaarung von *nilgerrensis* intensiv durch.

2. Die Fertilitätsverhältnisse. a) *Die generative Entwicklung.* Der Eintritt der Blühreife zeigt in $F_1 Rv$ folgende Verteilung:

- 46 Blüher im 1. Jahr (1950) 44,2 %
- + 27 Blüher im 2. Jahr (1951) 26,0 %
- + 8 Blüher im 3. Jahr (1952) 7,7 % der 1953 noch lebenden Pflanzen ($n = 104$)
- + 3 Blüher im 4. Jahr (1953) 2,9 %
- + 0 Blüher im 5. Jahr (1954) 0,0 %

Von den 1954 noch lebenden Pflanzen, die nicht geblüht hatten, waren von 6 die Ableger zum Blühen gekommen. 84 von 168 Originalpflanzen = 50 % haben ein blühfähiges Stadium erreicht.

Es zeigt sich keine nennenswerte Korrelation zwischen Blühfähigkeit und Lebensdauer. Die Absterbekurve der $F_1 Rv$ steigt nach dem 1. Jahr bis zum Sommer 1952 auf 50 % an; die Zahlen sämtlicher Pflanzen, die geblüht hatten, und die der nach der Blüte abgestorbenen Pflanzen zeigen einen gleichsinnigen Aufstieg (Abb. 5). Hatten die Pflanzen einmal das Stadium der Blühreife erreicht, so kamen sie in jedem folgenden Jahr wieder zur Blüte. Bei der $F_1 Rn$ war die Gesamtsterblichkeit der Nachkommen nur etwa $\frac{2}{3}$ so hoch. Darunter fallen in den ersten 3 Jahren keine Pflanzen, die geblüht und gefruchtet hatten. Hier wird also noch deutlicher, daß es sich nicht um ein Erschöpfen der vegetativen Kräfte durch den Blüh- und Fruchtungsprozeß handeln kann.

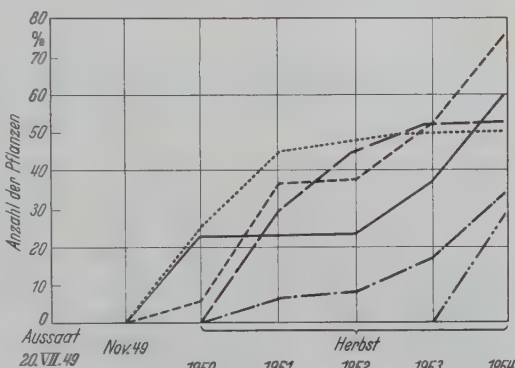


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf des Absterbens der $F_1 R$ -Pflanzen und des Erreichens der Blühfähigkeit

- | | | |
|-----------|---|--|
| — | % eingegangener Pflanzen | } obere Linie
$F_1 Rn$
untere Linie $F_1 Rv$ |
| - - - - | % der eingegangenen Pflanzen die geblüht hatten | |
| - · - · - | % der Pflanzen, die insgesamt geblüht haben | |
| · · · · · | % der Pflanzen, die insgesamt geblüht haben | |

Bei der $F_1 Rn$ hatten im Sommer 1951 erstmalig 19 von 64 = 29,7 % der Pflanzen geblüht, 64 % waren vegetativ geblieben, der Rest eingegangen. 1952 stieg der Prozentsatz der Blühreifen auf 45,3 %; von den noch lebenden Pflanzen blühten also 74,3 %.

- 0 Blüher im 1. Jahr = 0,0 %
- 19 Blüher im 2. Jahr = 35,0 % der 1953 noch lebenden 54 Pflanzen
- (s. Abb. 5) 10 Blüher im 3. Jahr = 18,5 %
- 5 Blüher im 4. Jahr = 9,3 %
- 0 Blüher im 5. Jahr = 0,0 %

b) *Blühreife und Ausläuferbildung.* Die $F_1 Rv$ zeigt unter den blühfähigen Pflanzen sowohl ausläuferlose als auch ausläuferbildende (von 13 Pflanzen ohne Ausläufer hatten 5 geblüht). Die 18 $F_1 Rn$ -Pflanzen ohne Ausläufer hatten dagegen alle nicht geblüht. Bei ihnen scheint eine allgemeine Wuchshemmung vorzuliegen, die sich aber nicht immer auf das Größenwachstum auswirkt (vgl. S. 754).

c) *Blütenproduktion.* Die Anzahl der Blütenstände und der Blüten je Pflanze findet sich in Tabelle 4. Die Verteilungskurven für die Zahl der Blütenstände/Pflanze

in den F_1R sind durch die Nähe des Nullpunktes naturgemäß schief. Es fragt sich, ob zwischen „Blütenstände“ oder „keine Blütenstände“ eine echte Alternative besteht. Für die Zahl der Blüten an sich liegt diese Frage noch näher,

da das Maximum in beiden F_1R in der Klasse 1—5 Blüten je Pflanze liegt. Die zum selben Zeitpunkt noch nicht blühenden Pflanzen bilden das eigentliche Maximum. Zwischen der Zahl der Blütenstände und der Gesamtzahl der Blüten je Pflanze besteht eine positive Korrelation. Für die gebildeten Blüten je Pflanze ist in den F_1R der Kurvenverlauf gleichsinnig und liegt etwa zwischen 0 und 50.

Die Differenz zwischen den Blütenzahlen je Blütenstand bei F_1Rv und F_1Rn ist nicht signifikant ($P=0,008$). Den niedrigsten Wert gab eine Pflanze der F_1Rn mit 23 Blütenständen; das Minimum liegt in der F_1Rv bei einer Pflanze mit 15 Blütenständen mit im Mittel 3,4 Blüten.

d) *Funktionsfähigkeit der ♂ Keimzellen (Tabelle 4)*. Beide Eltern produzieren viel und guten Pollen. Der Pollen von $F_1v \times n$ war zu 100 % schlecht. F_1Rv zeigte wie erwartet eine Annäherung an die Fertilität der Eltern. Die Funktionsfähigkeit des Pollens, die ganz grob — nach dem morphologischen Bild mikroskopischer Präparate — beurteilt wurde, streut zwischen 100 % schlecht und 100 % gut. Der Mittelwert liegt etwa bei 50 %. Die Verteilungskurve ist etwas schief, nicht klar binominal. In der F_1Rn waren alle Pflanzen pol-

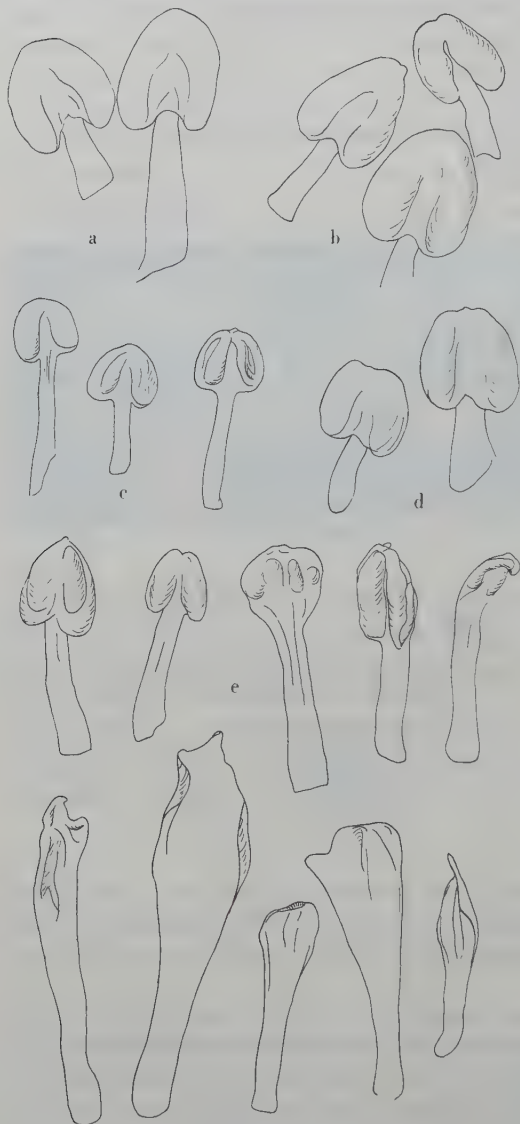


Abb. 6a—e. Antherentypen: a vesca, b nilg., c $F_1v \times n$, d F_1Rv , e F_1Rn

lensteril. Die nähere Untersuchung ergab jedoch auch in dieser Gruppe eine fließende Reihe zwischen dem Wert der $F_1=100\%$ schlechter Pollen in reichlichen Mengen über eine mengenmäßige Reduktion der Pollenbildung unter Kleinerwerden der Theken, Staminodialwerden der Antheren bis zur Bildung reiner, vielfach petaloid gebildeter Staminodien ohne Spuren männlich-sporogenen Gewebes. Abb. 6 gibt

ein Bild von der Variation der Antherenausbildung. Innerhalb bestimmter Grenzen war bei den einzelnen Pflanzen die Reduktion der Antheren gleichartig; ihr Typus blieb auch in 2—3 aufeinanderfolgenden Jahren für die Pflanze charakteristisch. Auch eine Verlagerung der Versuche von Dahlem nach Alt Ruppin unter veränderte Umweltverhältnisse brachte keine Änderung. Leider war der Umfang der Nachkommenschaften zahlenmäßig nicht groß, zumal eine ganze Anzahl der Pflanzen nicht geblüht hat.

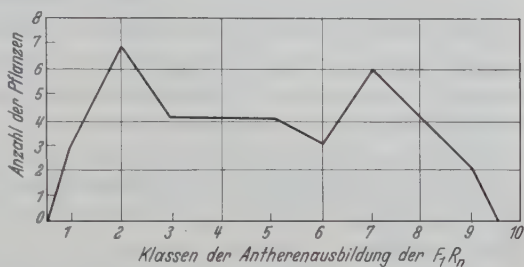


Abb. 7. Verteilung der Pflanzen der F_1R_n nach den Klassenwerten der Antheren

Es wurde versucht, die Pflanzen nach der Antherenausbildung in Gruppen zusammenzufassen nach einer Bonitierung in 10 Stufen, wobei 10 dem Zustand

Tabelle 4

	Zahl der Blütenstände je Pflanze	Zahl der Blüten je Pflanze	Mittlere Blütenzahl je Blütenstand	Antherenausbildung	Fertilität ♀	Fertilität ♂	Antherenklassen
vesca	nicht gezählt, viel	viel		gelb, rund, prall	100 %	viel, gut	10
nilger.	nicht gezählt, viel	etwa 10		groß, gelb, länglich, prall	100 %	viel, gut	10
$v \times n$	wenig	etwa 14		bräunlich, rund, geschrumpft	13 %	viel, schlecht	9
$n \times v$	sehr wenig	kaum geblüht		gelb, rund, geschrumpft, größer und gelber als $v \times n$	0 % Ansatz weder bei Selbstbestäubung noch freiem Abblühen	viel, schlecht, vereinzelt gute Körner ¹	9
F_1R_v	$3,87 \pm 0,38$	$11,9 \pm 1,35$	$3,01 \pm 0,23$	gelb, rund, prall	$3,4-83,5\%$	viel, ± gut	9—10
F_1R_n	$3,61 \pm 0,74$	$13,8 \pm 2,15$	$4,29 \pm 0,38$	$F_1 \rightarrow$ petaloide Staminod.	0—38 %	viel, schlecht $\rightarrow$ wenig, schlecht, $\rightarrow$ gar kein	1—9
F_1R_{2n}				$F_1 \rightarrow$ petaloide Staminod.	0—15,9 %	viel, schlecht $\rightarrow$ wenig, schlecht $\rightarrow$ gar kein	1—9

¹ Die Färbung nach A. OW CZARZAK 1951 mit Methylgrün-Phloxin-Farbgemisch charakterisierte diese Körner als nicht abgestorben, es gelang jedoch bisher nicht, eine Befruchtung mit dem Bastardpollen zu erzielen.

der vollfertilen Blüte entspricht, Stufe 9 dem der $F_1 v \times n$. Pflanzen ohne sporogenes Gewebe wurden in Klasse 1 eingestuft. Die Verteilung der einzelnen Typen ergab eine zweigipflige Kurve mit dem Mittelwert 4,73. Die beiden Maxima liegen bei den Klassenwerten 2 und 7 (Abb. 7). Das bedeutet, daß die Pflanzen am häufigsten sind, die eine geringere Spur sporogenen Gewebes besitzen und solche, die reduzierte verbildete Theken haben und dadurch bedingt eine Reduktion der Pollenmenge.

Unabhängig von dieser Reduktion der ♂ Organe ist die Ausbildung des Gynäceums. Es treten dadurch Pflanzen auf, die nicht mehr als Zwitter angesprochen werden können, sondern morphologisch und physiologisch reine Weibchen darstellen.

Infolge der Schwierigkeit für genetische Analysen, die in der langen Generationsdauer der *Fragaria* liegt, konnten bisher nur einige dieser $\pm$ weiblichen Individuen durch weitere Rückkreuzung mit *nilgerrensis* geprüft werden ($F_1 R_2 n$, s. Tabelle 1 und 4). Die Antherenausbildung dieser Nachkommen zeigte, daß in bezug auf die männliche Organbildung genetische Differenzen zwischen den einzelnen Reduktionstypen der $F_1 Rn$ bestehen.

Die $F_1 R_2 n$ -Familien ergaben die aus Tabelle 5 ersichtliche Antherenausbildung. Die Antherenklasse der Mutter ist jeweils kursiv gesetzt.

Tabelle 5

Pflanzen- anzahl	Klassen der Antherenausbildung										M
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
♀ 70/1 $\times$ n	12	10	3	12	8	11	3	5	1	—	4,08
♀ 68/5 $\times$ n	1	4	2	4	9	6	3	1	—	—	4,7
♀ 69/7 $\times$ n	4	12	3	—	—	—	—	—	—	—	1,95
♀ 68/4 $\times$ n	5	5	4	3	8	8	3	4	—	—	$\pm 0,14$ 4,5

Das Ergebnis läßt vermuten, daß bei einer Pflanze wie 49,69/7 die Zahl der noch vorhandenen *vesca*-Chromosomen sehr gering war, so daß keine starke Aufspaltung mehr erfolgen konnte. Dem Habitus nach war die Pflanze als lockerer Busch mit runden dunkelgrünen, stumpfen Blättern ähnlich *nilgerrensis* bonitiert worden. Das würde der Annahme einer weitgehenden Homozygotie von *nilgerrensis*-Chromosomen entgegenkommen.

In der Nachkommenschaft von 49,68/4 (Kl. 2) wurde unter 40 Pflanzen eine gefunden (51,91/6), deren Staminodien auf der Oberseite der petaloid entwickelten Spreiten mehr oder weniger zahlreich papillenartige Bildungen trugen. Die Blütenproduktion (26 Blüten) war gut, die Fruchtbarkeit aber (1677 Samenanlagen) gering (im Mittel nur 0,7% Ansatz).

Funktionsfähige Männchen oder Zwitter traten weder in $F_1 Rn$ noch in $F_1 R_2 n$ auf.

e) *Funktionsfähigkeit der ♀ Keimzellen.* Das Verhalten der $F_1 R$ in bezug auf die weibliche Fertilität zeigt Tabelle 4, Spalte 5.

Bei F_1 reicht die Streuung des Ansatzes der am besten entwickelten Scheinbeere bis zu 51,9% bei einem Durchschnittswert von 13%. In $F_1 Rv$ waren alle Pflanzen weiblich fertil, mit 3,4% als niedrigstem Wert bis zu 83,5%, im Mittel

35,3% $\pm$ 2,2. Die $F_1 Rv$ liegt also annähernd zwischen der F_1 und dem Rückkreuzungselter. Die Ausbildung der Früchte war je nach dem Besatz mit Nüßchen verschieden. Bei den fertilsten Scheinbeeren der einzelnen Pflanzen stieg der Ansatz bis zu 95,5% an. Also waren voll fertile Typen durchaus vertreten. Einige Pflanzen hatten in beiden Geschlechtern volle Fertilität. Sie waren aber nach dem Habitus nicht als reine *vesca*-Pflanzen anzusprechen; selbst eine Zwergpflanze war darunter. Die absolute Fruchtbarkeit, die sich in der Zahl der überhaupt von der Pflanze produzierten Nüßchen ausdrückt, lag zwischen 2 und 1514, streut also außerordentlich. Der Mittelwert der Nachkommenschaft liegt bei 299,5 $\pm$ 38,3.

Diese Verhältnisse entsprechen der Erwartung nach dem Verhalten der F_1 und den Befunden für die männliche Sterilität.

Auch die weibliche Fertilität der $F_1 Rn$ weicht von der der $F_1 Rv$ ab.

Für die 31 zur Blüte gekommenen Pflanzen der $F_1 Rn$ lag der Gesamtansatz im Mittel bei 9,46% $\pm$ 2,6; bei einer Streubreite der Einzelpflanzen von 0—38% ist es also stark nach der linken Begrenzung verschoben, d. h., die relativ fertilen Typen sind selten. Die Hauptmenge lag unter dem Wert der F_1 . Die Fertilität der Einzelpflanzen fällt schnell ab: von 38% zu 10,9% zu 6,9%, die Höchstwerte der einzelnen Scheinbeeren von 71,9% bei der fertilsten Pflanze zu 33,3% bei der nächsten. Die Höchstzahl von guten Nüßchen, die überhaupt von einer Pflanze gebildet wurden, war 1095 bei 21 Blüten. 13 von 31 Pflanzen setzten gar nicht an. Da indessen die Prüfung sich nur über 2 Jahre erstreckte, besteht die Möglichkeit, daß einzelne Pflanzen doch noch Nüßchen tragen, d. h. weiblich funktionsfähig sein könnten.

Histologische Untersuchungen der sterilen Fruchtböden an Mikrotomschnitten wurden vorgenommen, um das Entwicklungsstadium der Samenanlagen festzustellen. Dabei fanden sich z. T. sehr hohe Werte (bis 95%) intakt erscheinender Samenanlagen. Die Störung der Fertilität scheint häufig erst sehr spät einzusetzen, evtl. auch zygotische Letalität der Embryonen vorzuliegen.

Die Nachkommenschaften der 4 $F_1 R_2 n$ (Tabelle 6) ergeben ebenfalls Ansatzwerte, die zwischen 0 und dem Wert der F_1 streuen. Auch hier konnten histologisch z. T. hohe Werte normal erscheinender Anlagen nachgewiesen werden.

Tabelle 6

Werte der Mutterpflanze				Werte der $F_1 R_2 n$	
Mutterpflanzen	Ansatz der Mutter %	Absolute Nüßchenzahl	Ansatz der besten Beere %	Ansatz (Mittel der Nachkommenschaft) %	Höchster Ansatzwert (beste Scheinbeere) %
49,70/1	5,3	24	9,5	0,56 $\pm$ 0,66	14,5 (100)
49,69/7	0,0	—	—	2,05	15,9
49,69/5	0,0	—	—	2,00	
49,68/4	4,9			0,8	

Obwohl in der ersten $F_1 R_2 n$ 5 Pflanzen auftraten, die keinen Ansatz brachten bei sehr hoher Zahl von Samenanlagen (479—2666—1777—3757—809), liegt eine starke positive Korrelation zwischen der Zahl der Samenanlagen an einer Pflanze und der Höhe des Ansatzes vor. Der Korrelationskoeffizient nach BRAVAIS $r = 0,722$.

In der zweiten F_1R_2n sind von 18 Pflanzen 4 ohne Ansatz geblieben. Der Mittelwert für alle beträgt 2,05%.



Abb. 8. Blüten von *Fr. orientalis*: oben ♂, unten steriles ♂, Mitte ♀

Die Produktion an Samenanlagen an sich war sehr hoch, bei 1 Pflanze über 10000. Die Mutterpflanze der 2. und 3. Familie hatte in den beiden ersten Blühjahren, als der Ansatz bestimmt wurde, keinen Ansatz gehabt.

Morphologisch gleichen die weiblich sterilen Pflanzen den reinen Männchen polyploider Arten mit relativ großen Fruchtböden, da auch bei diesen die Samenanlagen angelegt und sogar noch Tetradenteilungen durchgeführt werden (Abb. 8).

Daß die Größe der Fruchtböden nicht in direkter Beziehung zur Fertilität steht, folgt aus den Werten der F_1R :

$$F_1Rv = 2,94 \text{ mm} \pm 0,054$$

$$F_1Rn = 3,65 \text{ mm} \pm 0,15.$$

Die Differenz ist statistisch gesichert ($P < 0,002$). Nach den Fertilitätszahlen wäre eher das umgekehrte Verhältnis zu erwarten.

3. Verteilung der Geschlechtstypen in den Rückkreuzungen. Nach der Ausbildung der beiderlei Geschlechtsorgane kann man die Rückkreuzungspflanzen in Zwitter, Männchen und Weibchen einteilen. Das geschieht vorläufig nur nach dem morphologischen und physiologischen Bild; die Analyse der genetischen Konstitution könnte nur auf Grund weiterer Kreuzungen erfolgen (Abb. 9). Danach ergibt sich in F_1Rn folgende Verteilung:

F_1Rn	Ansatz	Pollen	Geschlecht
17	+	+	♂
7	—	—	♀
4	+	—	♂
	schwach		
4	—	—	♀ steril ¹

¹ (geschlechtslos oder geschlechtlich neutral).

Bei der geringen Zahl von 32 Pflanzen läßt sich ein Spaltungsverhältnis nicht ableiten; jedenfalls aber *treten neben Zwittern diploide Männchen und Weibchen auf*. Eine weitere Aufklärung dieser Geschlechtsverhältnisse ist leider nur über die Weibchen und evtl. Zwitter möglich, weil ja alle Männchen und Zwitter pollensteril sind.

Stuft man in der gleichen Weise die Pflanzen der F_1R_2n in die 3 bzw. 4 Geschlechtsgruppen ein, so erhält man:

Tabelle 7. Geschlechtsverteilung in F_1R_2n

1	70 1 ♀ · n	36 ♀ +	5 + -	6 ♂ +	6 -
2	69 7 ♀ · n	8 ♀ +	7 +	3 ♂ +	1 -
3	68 5 ♀ · n	16 ♀ +	0 +	11 ♂ +	1 -
4	68 4 ♀ · n	18 ♀ +	4 ♀ +	6 ♂ +	3 -
	Σ 131	78 ♀ +	16 ♀ +	26 ♂ +	11 -

Abb. 9. Blüten verschiedener Pflanzentypen der F_1R_2n : oben ♀, unten links ♂, unten rechts steriles ♂

Obwohl diese Zahlen nicht sehr groß sind, geht daraus hervor, daß ein einfaches Spaltungsverhältnis, schon gar ein Rückkreuzungsverhältnis 1:1, nicht vorliegt.

Diskussion der Ergebnisse

Als Urtyp der *Fragaria* sehen LILIENFELD 1936, SCHIEMANN 1951, STAUDT 1951 u. a. die diploide *Fragaria vesca* an, die eine Reihe von Varietäten einschließt. Andere diploide Arten wie *Fr. nilgerrensis* und *Fr. viridis* zeigen morphologisch starke Abweichungen. Alle sind zwittrig, während die polyploiden Arten sämtlich diözisch sind. Die Männchen einzelner Arten zeigen eine gewisse Neigung

zur Zwitterigkeit, d. h., sie haben unter bestimmten Umständen schwachen Ansatz (SCHIEMANN 1931). Die Geschlechtsbestimmung der polyploiden Arten scheint nach dem einfachen Rückkreuzungsschema vor sich zu gehen bei weiblicher Heterozygotie. Unterscheidbare Geschlechtschromosomen konnten nicht analysiert werden (KIYARA 1930).

Die von der Verfasserin durchgeführten Kreuzungen geben ein Bild von den Beziehungen zwischen *Fr. nilgerrensis* und der vermutlichen Ursprungsart. Beide sind je nach den Umweltbedingungen $\pm$ gut miteinander kreuzbar. Die Kreuzung mit *Fr. nilgerrensis* als Mutter gelang erst nach langjähriger Wiederholung. Spontane Bastarde, wie sie zwischen *Fr. vesca* und *Fr. viridis* häufiger vorkommen, sind in den Sortimentsbeständen seit 1940 nicht gefunden worden. In den getrennten natürlichen Verbreitungsgebieten fällt die Möglichkeit dazu fort. Die Bildung von 7 Bivalenten und nachfolgende normale Verteilung in der Meiose des Bastards zeigt, daß beide Genome noch keine größeren strukturellen Differenzen aufweisen. Die morphologischen und physiologischen Erbfaktoren erfahren durch die Verlagerung in das artfremde Plasma bei der Bastardierung z. T. eine Veränderung ihrer Wirkungsstärke. Weitgehende Veränderungen der Ausbildung der Geschlechtsorgane und ihrer Funktionen sind in bezug auf das Artbildungsproblem von besonderem Interesse: sie führen zu eingeschlechtigen Typen.

Da sich der Bastard *nilg.* $\times$ *vesca* sowohl männlich wie weiblich steril erwiesen hat und der Bastard *vesca* $\times$ *nilg.* als männlich steril, konnte die Untersuchung nur an den Rückkreuzungen des Bastardes *v* $\times$ *n* als Mutter mit den beiden Ausgangsarten als Väter erfolgen.

A. Die morphologischen Merkmale

Ein einfaches Mendel-Spaltungsverhältnis ergab nur die Farbe der Scheinbeeren mit intermediärer F_1 und Penetranz der roten Farbe der *vesca*.

Die Ausfärbung der Blattstiele mit Anthocyan ergab in den Rückkreuzungen eine Aufspaltung in Rot, Schwachrot und Grün, ebenso die Ausfärbung der Ausläufer. Die genetische Grundlage hierfür könnte mit 2 Hauptgenen angenommen werden, die in der Kombination mit einem bestimmten Plasma in ihrer Wirkung modifiziert werden.

Artcharaktere, wie Höhe der Büsche, Ausläuferbildung, Blattform usw. sind nach den Verteilungskurven der Rückkreuzungs-Nachkommenschaften sämtlich polygen bedingt. Bei Blattgröße und Pflanzenhöhe ergaben sich starke Korrelationen. Während in bezug auf den Habitus als Ganzes die $F_1 Rn$ einen verhältnismäßig gleichartigen Charakter zeigte mit starker Dominanz der *nilgerrensis*-Form und die Variation vorwiegend in den Größenverhältnissen liegt, brachte die $F_1 Rv$ eine größere Vielförmigkeit. Es fällt das wechselnde Vorherrschen der beiderseitigen Artcharaktere im Laufe der individuellen Entwicklung der Pflanzen auf. In den Rückkreuzungs-Nachkommenschaften treten auch ganz abweichende Typen auf, die z. T. an andere Arten der Gattung erinnern wie *Fr. viridis* oder die hexaploide *Fr. moschata*.

Die Wüchsigkeit der Nachkommen ist bei einer Reihe genetischer Kombinationen vermindert. Sie zeigen entweder zwerghafte Wuchsformen oder Unfähig-

keit zur Ausläuferbildung. Beide Hemmungsformen können getrennt voneinander auftreten. Während der Bastard $v \times n$ in einzelnen Fällen zwergartig war, bildete er stets wie beide Eltern reichlich Ausläufer. Der Bastard $n \times v$ dagegen zeigte sowohl z. T. zwergartigen Wuchs wie auch eine sehr herabgesetzte Fähigkeit zur vegetativen Vermehrung. Das häufigere Auftreten von Hemmungen der Wuchsleistung in der $F_1 Rn$ als in der (zahlenmäßig größeren) $F_1 Rv$ kann eine doppelte Ursache haben. Entweder üben vereinzelte in ein *nilgerrensis*-Genom eingelagerte *vesca*-Chromosomen eine stärkere Hemmwirkung aus als umgekehrt einzelne *nilgerrensis*-Chromosomen im *vesca*-Genom, oder es liegt hier eine verstärkende Hemmwirkung durch das gestörte Zusammenspiel zwischen Genom und Plasmon oder — vorsichtiger gesagt — Plasma vor, die um so deutlicher wird, je mehr *nilgerrensis*-Chromosomen in das artfremde *vesca*-Plasma eingelagert werden. Die Tatsache, daß der F_1 -Bastard relativ geringe Störungen der vegetativen Organe zeigte, spricht dafür, daß es sich um die Kombinationswirkung zwischen rezessiven *nilgerrensis*-Genen und *vesca*-Plasma handelt.

B. Die generative Entwicklung und Fertilität

Eine weitere Hemmung liegt in der Verzögerung der Blühfähigkeit, die bei einer ganzen Reihe von Pflanzen beider Rückkreuzungsrichtungen auftritt. Ein Teil erreichte während der Versuchsdauer (5 Jahre) das Blühstadium gar nicht. Bei der $F_1 Rv$ zeigte sich diese Verzögerung der Blühreife unabhängig von den vegetativen Wuchshemmungen, während sie bei der $F_1 Rn$ mit der Unfähigkeit zur Ausläuferbildung korreliert war. Die Veränderungen im Entwicklungsablauf der Pflanzen durch unausbalancierte Genkombinationen verstärken sich, wenn die Mehrzahl der Chromosomen in fremdem Plasma liegt.

Die Ausbildung der Geschlechtsorgane und ihre Funktionsfähigkeit ist reziprok verschieden. Der Bastard mit *vesca*-Plasma und von jedem Elter 7 Chromosomen ist normal zwittrig (Tabelle 7), zeigt aber in beiden Geschlechtern stark herabgesetzte Fertilität, bei Artbastarden eine gewohnte Erscheinung. Der Pollen ist 100%ig schlecht, die Samenanlagen im Mittel nur zu 13% fertil. Die genetische Konstitution der Rückkreuzungsnachkommen ist derart, daß von dem Rückkreuzungsvater auf jeden Fall ein vollständiges Genom in den Bastard hineinkam, von der F_1 -Pflanze das *vesca*-Plasma und 7 Chromosomen, die sich zusammensetzen können aus 7 *vesca*-Chromosomen im einen Extrem bis zu 7 *nilgerrensis*-Chromosomen im anderen Extrem oder allen dazwischen möglichen Kombinationen (1 + 6, 2 + 5, 3 + 4 usw.). Enthält nun die neu entstandene Pflanze mindestens 7 *vesca*-Chromosomen wie bei $F_1 Rv$, so wird immer ein Zwitter ausgebildet (wie ja auch der F_1 -Bastard ein Zwitter war). Er ist je nach der Zahl der vorhandenen *vesca*-Chromosomen mehr oder weniger fertil, wobei die ♂ Fertilität immer stärker gehemmt ist. Von Pflanzen, die voll fertil sind wie die reine Art, ist anzunehmen, daß sie fast nur *vesca*-Chromosomen enthalten. Dabei lassen sich aber bei der schwierigen Analyse einzelner Faktoren des Habitus nach dem Erscheinungsbild nicht die Pflanzen auslesen, die ausschließlich *vesca*-Merkmale zeigen, also die fertilsten sein müßten. Bei der Variabilität der quantitativen Merkmale läßt sich nicht entscheiden, ob nur einzelne Chromosomen einen besonderen Einfluß auf die Ausbildung der Geschlechtsorgane haben oder ob

alle in gleicher Weise daran beteiligt sind. Die Tatsache, daß die Fertilität der Rückkreuzungsnachkommenschaft eine fließende Reihe darstellt zwischen dem Zustand des F_1 -Bastardes und dem des reinen *vesca*-Typus, spricht für eine Beteiligung mehrerer Chromosomen. Dabei läßt sich jedoch nichts darüber aussagen, an welchem ontogenetischen Punkt diese einzelnen Faktoren ansetzen und ob ihre Wirkungen alle gleich bedeutsam sind.

Anders fällt die Rückkreuzung mit *nilgerrensis* aus. Der Habitus zeigt erwartungsgemäß starke Annäherung an *nilgerrensis*, in der Geschlechtsausbildung treten aber keine Angleichungen an den fertil-zwittrigen Charakter der Vaterart auf. Der Befund an den bisher blühenden Pflanzen ergab 17 Zwitter, und zwar keinen mit einer Fertilität, die über die des F_1 -Bastardes hinausging, 4 „Weibchen“ mit regelrechten Staminodien und $\pm$ fertilen Fruchtböden, 7 Pflanzen, die im Laufe von 2 Untersuchungsjahren keinen Ansatz ergaben und daher, obwohl pollensteril, als „Männchen“ eingestuft wurden, weil sie Pollen bilden, und 4 Pflanzen, bei denen weder die weiblichen noch die männlichen Geschlechtsorgane normal ausgebildet und funktionsfähig sind, die also neutral oder sterile Weibchen sind.

Um die genetische Grundlage der abgeänderten Geschlechtsausbildung zu analysieren, waren 4 Pflanzen der $F_1 Rn$ nochmals mit *nilgerrensis* rückgekreuzt worden, 3 als Zwitter und 1 als Weibchen eingestufte Pflanzen. Alle 4 Pflanzen gaben in ihren Nachkommenschaften wieder die in der $F_1 Rn$ vertretenen Geschlechtstypen, jedoch in Verteilungen, die eine genetische Differenz der Mutterpflanzen erwiesen. Die histologische Untersuchung der Fruchtböden der als Männchen eingestuften Pflanzen ergab verschieden hohe Prozentsätze anscheinend gut ausgebildeter Samenanlagen; die Hemmungsreihe in der Ausbildung der weiblichen Organe ergibt nicht nur eine fließende Reihe verschieden hoher Fertilität, sondern auch die nichtfunktionsfähigen Samenanlagen zeigen verschiedene Stufen der Reduktion bzw. des Degenerationszeitpunktes.

C. Entstehung diözischer Formen

Nach Untersuchungen von STAUDT 1952 an *Fr. orientalis* führen bei den diözischen *Fragarien* die Männchen im Gynäceum Keimzellbildung bis zur Tetradenteilung durch; danach tritt Degeneration ein; man findet also geschrumpfte Samenanlagen. Bei den Weibchen ist in den Staminodien zwar sporogenes Gewebe vorhanden, die Pollenmutterzellen treten aber höchstens in die frühe Prophase ein und degenerieren dann. Es kommen Männchen vor, die eine zwittrige Tendenz haben, d. h. die vereinzelt Scheinbeeren bilden und wenige Nüßchen produzieren. Der Mechanismus der Geschlechtsbestimmung bei den polyploiden diözischen *Fragarien* fügt sich also nicht einfach in das 1:1-Rückkreuzungsschema ein. Phylogenetisch interessiert besonders, wie diese polyploiden diözischen *Fr. orientalis* $4n$, *Fr. moenchii* $6n$ usw. aus den diploiden zwittrigen Formen entstanden sind.

STAUDT 1954, 1956 versucht die Entstehung bei Autopolyploiden zu erklären mit der Annahme, daß an mehreren Stellen im Laufe der phylogenetischen Entwicklung Mutationen auftraten, die den von JONES 1934 bei *Zea mays* gefundenen

entsprechen. Schwer zu erklären bliebe dabei, warum keine polyploiden Zwitter gefunden wurden.

Entweder sind die entsprechenden Arten bisher nur nicht aufgefunden worden, oder es ist primär der Schritt von der Zwitterigkeit zur Diözie erfolgt und die Polyploidisierung erst sekundär vor sich gegangen. Nach mündlicher Mitteilung von Prof. SCHIEMANN findet sich im Herbar des British Museum in London ein *Fragaria*-Blatt mit einer nicht bestimmten diözischen *Fragaria*-Art aus Nepal, die einen diploiden Habitus-Charakter zeigt. Eine solche Form ist in Kultur oder aus Versuchen bisher nicht bekannt. Die Chromosomenzahl konnte nicht festgestellt werden. Ein erster Hinweis auf die Möglichkeit der Entstehung diözöischer diploider Formen in zwittrigen Arten findet sich bei A. H. DUCHESNE 1766, der von einer abortiven *vesca*-Form in England berichtet, die sich bei Weiterzucht aus einzelnen vorhandenen Nüßchen konstant gehalten hat.

SCHIEMANN 1931 führte Kreuzungen zwischen diploiden Zwittern z. T. hybrider Herkunft sowie zwischen diesen und oktoploiden Diözisten aus und fand eine Reihe geschlechtlicher Zwischenstufen, von „morphologischen“ sterilen Weibchen nur mit Staminodien bis zu physiologischen Männchen. Sie führt diese Unterschiede auf Sterilitätsfaktoren zurück und spricht daher nicht von genetischer, sondern von physiologischer Diözie.

Aus den vorliegenden Versuchen geht einwandfrei hervor, daß bei der Entstehung der hier gefundenen Weibchen oder Männchen das Plasma beteiligt ist. (Die Männchen würden den physiologischen Männchen der Versuche SCHIEMANNs entsprechen.) So eindeutig wie bei dem klassischen Fall einer geschlechtsbestimmenden Wirkung des Plasmas bei *Streptocarpus* (OEHLKERS 1940/41) liegen die Verhältnisse allerdings nicht. Es ist offenbar keine selbständige weiblich oder männlich bestimmende Wirkung des Plasmas vorhanden, vielmehr ein typischer Fall von Kombinationswirkung von einzelnen Genen oder Chromosomen mit dem Plasma, die zu einer bestimmten Geschlechtsbildung führt. Wie es scheint, sind im Gegensatz zu *Streptocarpus* eine größere Anzahl von Faktoren dafür verantwortlich zu machen. Sonst sollten in den Rückkreuzungen einfache Spaltungszahlen auftreten.

Bei Kreuzungen von *Solanum*-Arten beschreibt KOOPMANNs 1951/52 (zit. nach HARTE 1954) einmal Reduktionserscheinungen des Gynäceums, bei der Benutzung anderer Arten Reduktion des Andröceums bis zur Bildung von Samenanlagen an der Basis der Staubblätter. Sie fand eine wechselnde Aufspaltung der verschiedenen Geschlechtstypen, die ebenfalls auf dem Zusammenwirken mehrerer Gene mit dem Plasma beruhen muß.

D. Geschlechtsbestimmung und Sterilität

Offenbar ist bei unserer *Fragaria*-Kreuzung der Fall so, daß bei den normal zwittrigen Arten *vesca* und *nilgerrensis* ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen den die Ausbildung der männlichen und weiblichen Organe bestimmenden Genen vorhanden ist, die sämtlich in gleicher Weise mit dem arteigenen Plasma eine Kombinationswirkung zeigen. Brächte man nun alle diese Gene von *Fr. nilgerrensis* in das artfremde Plasma von *vesca* hinein, so würde für beide Faktorengruppen — sowohl weiblich wie auch männlich bestimmende — die Wirksamkeit

gestört und als Folge die Fertilität stark herabgesetzt; vermutlich würden in beiden Geschlechtern keine funktionsfähigen Organe mehr ausgebildet werden. In diese Gruppe gehören dann die 4 Pflanzen, die in den Versuchen ohne Antheren und mit sterilem Gynäceum gefunden wurden. Die experimentelle Bestätigung ist insofern erschwert, als die Typen, die nach der Hypothese die günstigsten für eine weitere Rückkreuzung mit *nilgerrensis* wären, auch in der weiblichen Fertilität stark herabgesetzt sind.

Es wäre denkbar, daß je nach der Gruppe der homozygot in der Rückkreuzungspflanze vorhandenen Gene entweder das eine oder das andere Geschlecht stärker reduziert wird. Es scheint also eine gewisse Dominanz oder größere Wirkungsstärke — zumindest einzelner *vesca*-Gene — gegenüber den *nilgerrensis*-Genen vorzuliegen. Sonst müßte man eine bezüglich des Geschlechtes einheitliche Rückkreuzungs-Nachkommenschaft erwarten, da ja immer ein ganzes Genom von *nilgerrensis* stammt. Daß bereits der F_1 -Bastard eine geschwächte Fertilität zeigt, spricht jedoch dafür, daß diese Dominanz nicht bei allen Faktoren vollständig auf seiten der *vesca*-Gene liegt. Es macht sich eine Hemmung der Fertilität bemerkbar, die offenbar von der Kombination der *nilgerrensis*-Gene mit dem *vesca*-Plasma ausgeht.

Wird eines der an der Ausbildung der Geschlechtsorgane beteiligten Gene in seiner Auswirkung gehindert, sei es durch Abänderung seiner Struktur oder durch Veränderung der Wirkungsbedingungen, so fällt die Wirkung der ganzen Kette von Genen fort, welche die Leistung dieses einen als Grundlage ihrer eigenen Funktion benötigen. Es kann also das auslösende Moment, das eine Pflanze z. B. männlich steril werden läßt, ebensowohl im Anfang der entwicklungsphysiologischen Reihe liegen wie nahe ihrem Ende. Es bleibt bisher der Entscheidung des einzelnen Forschers überlassen, an welchem Punkt dieser Entwicklungsreihe er die Grenze zwischen *Geschlechtsfaktor* und *Sterilitätsfaktor* setzen will. Im allgemeinen ergibt sich für das einzelne Objekt aus der Beobachtung der natürlichen Formen eine besondere Definition. So kann man den von BATESON und GAIRDENER 1921 beschriebenen *Linum*-Fall verschieden interpretieren. Man kann die Wirkung des Plasmas der Sippe *procumbent* auf den Faktor *m*, die zu Fehlen der Antheren führt, durchaus als Hemmwirkung auffassen und von männlich sterilen Zwittern sprechen. Es liegt kein so großer Unterschied vor zu den *Epilobium*-Fällen bei MICHAELIS 1954, in denen reziprok eine Pollensterilität auftritt. Meines Erachtens besteht keine zwingende Notwendigkeit, auf Grund der monofaktoriellen Aufspaltung in weibliche und zwittrige Pflanzen von Geschlechtsrealisatoren zu sprechen. Während bei *Linum* nur die Kombination des einen Genoms mit dem fremden Plasma eine veränderte Wirkung hervorbringt, äußert sich bei *Streptocarpus* und *Epilobium* auch die andere Neukombination in einer von der Ausgangsform abweichenden Weise, wie schon OEHLKERS 1952 hervorhebt. Die Bezeichnungen Hemmungsfaktor oder Faktor mit aktiver Leistung sind jedoch relative Begriffe, bezogen auf die für die Untersuchungen benutzten Ausgangsformen, solange über die tatsächliche genphysiologische Wirkungsweise nichts bekannt ist. Bei höheren Blütenpflanzen haben sich aber noch keine Angriffspunkte für die Untersuchung dieser schwierigen Frage gefunden (MARQUARDT 1952 versuchte eine Modellvorstellung von den Verhältnissen zu geben). Es sei denn, daß wie bei *Streptocarpus* Änderungen der Relation zwischen den Geschlechts-

valenzen von Genom und Plasma zur *positiven* Geschlechtsumwandlung von Organen führen.

Es besteht vielfach die Neigung, von Geschlechtsrealisatoren zu sprechen, wenn ein einfach mendelnder Fall bezüglich der verschiedenen Geschlechtstypen vorliegt. Damit wäre immer nur das Verhalten der Nachkommenschaft, also die genetische Konstitution, entscheidend für die Einstufung der einzelnen Pflanze in ihren Geschlechtstypus (KNAPP 1917). Die bei Mais gefundenen Mutanten lassen sich genetisch einwandfrei als Weibchen und Männchen einer diözischen Sippe einordnen (LEWIS 1942). Ist aber wie bei den *Fragaria*-Bastarden oder den Artbastarden von *Streptocarpus* das Plasma bei der Ausbildung der rein weiblichen Individuen beteiligt, so ist es bisher noch nicht gelungen, aus Primärzwittern experimentell ein einfaches, stabiles, rein diözisches Geschlechtsverhältnis zu erhalten. Es wird anscheinend nur möglich sein, auf diese Weise gyno- oder andro-diözische Pflanzensippen zu konstruieren.

Tabelle 8. Schema für die genetische Konstitution der verschiedenen Geschlechtstypen

1, 2 usw. bezeichnen die einzelnen Chromosomen, V und N bezeichnen das Plasma. Die Chromosomen 1, 2, 3 seien vorwiegend Träger der männlichen Tendenzen, 4, 5, 6, 7 Träger der weiblichen Tendenzen.

Die fettgedruckten Zahlen bezeichnen die Chromosomen von *Fr. vesca*, die dünn gedruckten die von *Fr. nilgerrensis*.

Beobachtet	<i>Fr. vesca</i>	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♀ fertil
Beobachtet	<i>Fr. nilgerr.</i>	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	N	= ♂ fertil
Beobachtet	F ₁ -Bastard	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♂ pollensteril ♀ schlecht fertil
Modell	F ₁ R _v z. B.	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♂ ± fertil
Modell	F ₁ R _n z. B.	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♂ pollensteril
	oder	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♂ pollensteril ♀ schlecht fertil
	oder	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= ♀ herabgesetzt fertil
	oder	1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7	V	= — steriles Weibchen

Die Untersuchungen an den verschiedenen Objekten haben 2 Typen der Geschlechtsbestimmung aufgezeigt: der Unterschied der Geschlechter ist durch die Differenz von meistens 2 Genen oder Genpaaren bedingt, ohne Differenzen in der Zusammenwirkung mit dem Plasma oder — es sind an der unterschiedlichen Ausbildung der Männchen, Weibchen und Zwitter verschiedene Wirkungsstärken von einem oder mehreren Genpaaren in ihrer Kombination mit bestimmten Plasmatypen beteiligt.

Die vorliegende Analyse der Kreuzung zweier diploider *Fragaria*-Arten hat ein Beispiel für den zweiten Modus geliefert. Die Langwierigkeit des Versuchesablaufes ließ es wünschenswert erscheinen, die Ergebnisse schon zur Diskussion zu stellen.

Zusammenfassung

1. Die morphologisch eigenartig geprägte diploide *Fragaria nilgerrensis* wurde mit der vermutlichen Stammform der Gattung, der diploden *Fragaria vesca*, gekreuzt. Da der Bastard ♂ steril ist, wurden die Rückkreuzungen mit den Eltern morphologisch und bezüglich der Ausbildung der Geschlechtsorgane untersucht.

2. Der Bastard ist phänotypisch intermediär ausgebildet; er zeigt völlige Pollensterilität und herabgesetzte weibliche Fertilität.

3. Einfach mendelnde Habitusfaktoren konnten nicht festgestellt werden. Die Artunterschiede sind überwiegend quantitativer Natur und ergeben in den Nachkommenschaften fließende Übergänge, die jeweils auf das Mitwirken einer ganzen Reihe genetischer Faktoren hindeuten.

4. Mehrere morphologische, artspezifisch wichtige Merkmale wie Blattgröße, Höhe der Pflanzen, Ausläuferbildung, Blühreife, Blütengröße usw. wurden auf Größe und Art ihrer Variabilität hin untersucht. Bei einigen Merkmalen wurde Korrelation festgestellt.

5. Unterschiedliches Verhalten zeigen die beiden Rückkreuzungs-Nachkommenschaften bezüglich der Fertilität und der Ausbildung der Geschlechtsorgane. a) Die Rückkreuzung mit der Mutter, $F_1 Rv$, ergibt lauter Zwitter mit verschieden guter Fertilität, die Höchstgrenze bildet die Fertilität von *vesca*, die unterste Stufe die Fertilität des F_1 -Bastardes. b) Die Rückkreuzung mit dem Vater, $F_1 Rn$, ergibt eine Aufspaltung in 17 Zwitter, 4 Weibchen, 7 Männchen und 4 völlig sterile Pflanzen.

Aus dieser Verschiedenheit wird auf einen Einfluß des Plasmas auf die Ausbildung der Geschlechter geschlossen.

6. Es werden die Begriffe Geschlechts- und Sterilitätsfaktoren diskutiert und versucht, die einzelnen Geschlechtstypen zu definieren.

Durch die Verlagerung der Geschlechts- und Fertilitätsgene von *Fragaria nilgerrensis* in das Plasma von *Fragaria vesca* wird der ausbalancierte zwittrige Zustand verschoben; es wird entweder das eine oder das andere Geschlecht unterdrückt, je nach der Gruppe der Chromosomen, die im artfremden Plasma homozygot sind. Es wird erwartet, daß Nachkommen dieser eingeschlechtigen Pflanzen durch Faktoren-Umkombinierung immer wieder Zwitter herauspalten, da beide Geschlechter bezüglich mehrerer Chromosomen Heterozygoten sind.

Ein stabiles Geschlechtsverhältnis ist an ihnen nicht ohne weiteres zu erhalten.

Literatur

- BATESON, W., and A. F. GAIRDNER: Male sterility in flax, subject to two types of segregation. J. Genet. **11** (1921). — CARDOT, M. J.: Notes sur des Rosacées d'Extrême Orient. Bull. Mus. Hist. natur. **22**, 396 (1916). — CASPARI, E.: Cytoplasmic inheritance. Advanc. Genet. **2** (1948). — CORRENS, C.: Zur Kenntnis der Geschlechtsformen polygamer Blütenpflanzen und ihrer Beeinflussbarkeit. Jb. wiss. Bot. **44** (1907). — Bestimmung, Verteilung und Vererbung des Geschlechts. In Handbuch der Vererbungswissenschaft, Bd. 2 (1928). — DUCHESNE, A. N.: Histoire Naturelle des Fraisiers. Paris 1766. — FEDOROWA, N.: Polyploid interspecific hybrids in the genus *Fragaria*. Genetica **16** (1934). — GAIRDNER, A. F.: Male sterility in flax II. A case of reciprocal crosses differing in F_2 . J. Genet. **21** (1929). — GOLDSCHMIDT, R. B.: „Repeats“ and the modern theory of the gene. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **36** (1950). — Evolution, as viewed by one geneticist. Amer. Scientist **40** (1952). — HARTE, C.: Genetik

der Samenpflanzen. Fortschr. Bot. **15** (1954). — HARTMANN, M.: Die Sexualität. 2. Aufl.: Gustav Fischer 1956. — ICHIJIMA, G.: Cytological and genetic studies in *Fragaria*. Genetics **11** (1926). — JONES, D. F.: Unisexual maize plants and their bearing on sexdifferentiation in other plants and in animals. Genetics **19** (1934). — KAPPERT, H.: Untersuchungen über Plasmonwirkungen bei *Aquilegia* (Gynodioecie-Heterosis-Gestalt des Sporns). Flora (Jena) **1943**. — KIHARA, H.: Karyologische Studien an *Fragaria* mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. Cytologia **1** (1930). — KNAPP, E.: Bemerkungen zu Geschlechtsbestimmungsfragen. Flora (Jena) **37** (137), 139 (1943). — KUHN, E.: Die Geschlechtsformen bei *Fragaria* und ihre Vererbung. Züchter **2** (1930). — LEWIS, D.: The evolution of sex in flower plants. Biol. Rev. **17**, 46 (1942). — LILLENFELD, F. A.: Karyologische und genetische Studien an *Fragaria* II. Ist *Fragaria elatior* eine autopolyploide Pflanze? Jap. J. Bot. **8** (1936). — Karyologische und genetische Studien an *Fragaria* III. Geschlechtsverhältnisse in den F₂- und weiteren Folgegenerationen des Bastards zwischen der getrenntgeschlechtlichen *Fr. elatior* und der zwittrigen *Fr. nipponica*. Mem. Coll. Agric. Kyoto **38** (1936). — LONGLEY, A. F.: Chromosomes and their significance in strawberry classification. J. agric. Res. **32** (1926). — LOSINA-LOSINSKAJA, A.: Revision critique du genre *Fragaria*. Bull. Jard. Bot. USSR. **25** (1926). — MANGELSDORF, A. J., and E. M. EAST: Studies on the genetics of *Fragaria*. Genetics **12** (1927). — MARQUARDT, H.: Die Natur der Erbträger im Cytoplasma. Ber. dtsh. bot. Ges. **65** (1952). — MICHAELIS, P.: Wege und Möglichkeiten zur Analyse des plasmatischen Erbgutes. Biol. Zbl. **73**, 353 (1954). — MOEWUS, F.: Über Mutationen der Sexualgene bei *Chlamydomonas*. Biol. Zbl. **60**, (1940). — OEHLKERS, F.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindley III. Neue Ergebnisse über die Genetik von Wuchsgestalt und Geschlechtsbestimmung. Ber. dtsh. bot. Ges. **58** (1940). — IV. Weitere Untersuchungen über Plasmavererbung und Geschlechtsbestimmung. Z. Bot. **37** (1941). — Über Erbträger außerhalb des Zellkerns. Ber. naturforsch. Ges. Freiburg **39** (1949). — Neue Überlegungen zum Problem der außerkaryotischen Vererbung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84** (1952). — OWCARZAK, A.: A rapid method for mantrng pollen grains with special regard to sterility studies. Stain Technol. **27** (1951). — PELLEW, C.: Types of segregation. J. Genet. **6**, 317 (1917). — POWERS, L.: Meiotic studies of crosses between *Fragaria ovalis* and *Fr. Ananassa*. J. agric. Res. **69** (1944). — RENNER, O.: Zur Kenntnis der Plastiden- und Plasmavererbung. Cytologia, Fujii-Jubil.-Bd. **1937**. — RHOADES, M.: Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. Science **73** (1931). — Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. Proc. Var. Acad. Sci. U. S. A. **29** (1943). — RUDLOFF, C. F.: Entwicklungsphysiologische Studien in der Gattung *Fragaria*. I. Gartenbauwiss. **3** (1930). — RYGG, G. L.: Paternal and maternal inheritance in *Fragaria*. Science **75** (1932). — SANSONE, F. W.: Some experiments with *Geranium* species. J. Genet. **33** (1936). — SCHIEMANN, E.: Geschlechts- und Artkreuzungsfragen bei *Fragaria*. Bot. Abh., H. **18** (1931). Artkreuzungen bei *Fragaria* II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **73** (1937). — Offene Fragen in der Gattung *Fragaria* Z. Tschermak-Festschrift **30** (1951). — SCHWEMMLE, J.: Die Klärung der reziproken Verschiedenheit der Bastarde zwischen *Epilobium parviflorum* und *E. roseum* auf Grund hybridologischer Untersuchungen ihrer Sterilitätserscheinungen. Bibl. Bot. **1927**. Plastiden und Genmanifestation. Flora, N. F. **27** (1944). — STAUDT, G.: Cytogenetische Untersuchungen an *Fragaria orientalis* Los. und ihre Bedeutung für Artbildung und Geschlechtsdifferenzierung in der Gattung *Fragaria* L. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 361 (1951). — Über Fragen der phylogenetischen Entwicklung einiger Arten der Gattung *Fragaria*. Züchter **21**, 222 (1951). — Die Vererbung des Geschlechts bei der tetraploiden, diözischen *Fragaria orientalis*. Ber. dtsh. bot. Ges. **67**, 384 (1954). — VALLEAU, W. D.: Sterility in the strawberry. J. agr. Res. **12**, 3 (1918). — WETTSTEIN, F. v.: Untersuchungen zur plasmatischen Vererbung I. Linum. Biol. Zbl. **65** (1946).

Dozent Dr. URSULA NÜRNBERG-KRÜGER, Pflanzenphysiologisches Institut
der Humboldt-Universität Berlin, Berlin N 4, Invalidenstr. 43

X INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS

McGill University, Montreal, P. Q., Canada, August 20—27, 1958
General Organizing Committee

29th September, 1958

Professor Dr. GEORG MELCHERS,
Max-Planck-Institut für Biologie,
Corrensstraße 41,
Tübingen

Dear Professor MELCHERS, —

At the closing plenary session of the X International Congress of Genetics the fact that 1958 happens to be the Jubilee Year of the Zeitschrift für Vererbungslehre, the oldest journal devoted to Genetics, was drawn to our attention by Professor CURT STERN.

It was recognized that the Zeitschrift für Vererbungslehre, established 50 years ago has served genetics well during these years and it was felt appropriate that the following resolution be presented to the Congress:

“On the occasion of the 50 year jubilee of the Zeitschrift für Vererbungslehre, the oldest journal devoted to Genetics, the X International Congress of Genetics sends its greetings to this international publication and expresses best wishes for the continued growth and service to Genetics.”

This resolution was unanimously adopted by the Congress.

To these official greetings may I add a personal word of appreciation and my sincere best wishes.

Yours very truly,

J. W. BOYES

Chairman & General Secretary

Autorenverzeichnis des 89. Bandes

- ARNOLD, C.-G., Untersuchungen zur Pollen-fertilität trisomer Oenotheren. S. 161
- BERGFELD, R., Mutationsauslösung durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus* L. S. 131
- Untersuchungen an einigen Blattfarben-mutanten der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* L. S. 143
- BLACKITH, R. E., und M. I. ROBERTS, Far-benpolymorphismus bei einigen Feld-heuschrecken S. 328
- BRESCH, C., und P. STARLINGER, Zum Pro-blem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. Die Hypothese der kom-pletten Kooperation. S. 459
- BRINK, R. A., and B. MIKULA, Plant color effects of certain anomalous forms of the R^r allele in maize. S. 94
- CLARK, A. M., The mutagenic action of pyronin in *Drosophila*. S. 123
- CUANY, R. L., A. H. SPARROW and V. POND, Genetic response of *Antirrhinum majus* to acute and chronic plant irradiation. S. 7
- DIERS, L. s. STUBBE, W. S. 320
- DOWRICK, G. J., Abnormal gametogenesis and embryo abortion in the pear variety Beurré Bedford (*Pyrus communis*). S. 80
- EBELL, U. s. OEHLKERS, F. S. 559
- EBERSOLD, W. T. s. LEVINE, R. P. S. 631
- ENCKE, W., Die Abhängigkeit der Körper-farbe bei *Drosophila melanogaster* von einem genbedingten Hemmstoff. S. 697
- ESSER, H. s. POHLEY, H.-J. S. 707
- ESSER, K., und J. STRAUB, Genetische Un-tersuchungen an *Sordaria macrospora* AUERSW., Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. S. 729
- GIERER, A. s. MUNDVY, K. W. S. 614
- GOODMAN, F., A study of the mechanism of resistance to ultraviolet light in a strain of *Neurospora crassa*. S. 675
- GOTTSCHALK, W., Untersuchungen zum Pro-blem der Herabregulierung der Chromo-somenzahl in experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen. S. 52
- Über Abregulierungsvorgänge bei künst-lich hergestellten hochpolyploiden Pflan-zen. S. 204
- HADORN, E., und I. ZIEGLER-GÜNDER, Unter-suchungen zur Entwicklung, Geschlechts-spezifität und phänogenetischen Auto-nomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von *Drosophila melanogaster*. S. 221
- s. ZIEGLER-GÜNDER, I. S. 235
- HAGEMANN, R., Somatische Konversion bei *Lycopersicon esculentum* MILL. S. 587
- HARTE, C., Untersuchungen über die Gonen-konkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. I. Mittei-lung: Die individuelle Komponente der Variabilität. S. 473
- Untersuchungen über die Gonenkonkur-renz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. II. Mitteilung: Die Um-weltkomponente der Variabilität. S. 497
- Untersuchungen über die Gonenkonkur-renz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. III. Mitteilung: Die genetische Komponente der Variabilität. S. 715
- HILL, R. F., The mutation of *Escherichia coli* to resistance to bacteriophages T1 and T1s. S. 355
- KAPPUS, A., Untersuchungen über die Ver-breitung des *sulfurea*-Merkmales in Po-pulationen von Wildoenotheren. S. 647
- KARLIK, A., Vererbungsversuche mit *Droso-phil a ambigua* POM. S. 448
- KLEIN, D. T., Randomness of nuclear Distribution in Conidia of *Neurospora* heterokaryons. S. 323
- KÖHLER, D., Zur Vererbung der Monözie beim Hanf. S. 437
- KUNZE-MÜHL, E., E. MÜLLER und D. SPER-LICH, Qualitative, quantitative und jahres-zeitliche Untersuchungen über den chro-mosomalen Polymorphismus natürlicher Populationen von *Drosophila subobscura* COLL. in der Umgebung von Wien. S. 636
- LEVINE, R. P., and W. T. EBERSOLD, The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas rein-hardi*. S. 631
- LINDSLEY, D. L., Spermatogonial exchange involving the X but not the Y chromo-some in *Drosophila melanogaster*. S. 103
- LINNEBT, G., Kerngesteuerte Gynodiözie bei *Salvia nemorosa*. S. 36
- MALY, R., Eine genetisch bedingte Störung der Zelltrennung bei *Paramaecium aurelia* var. 4. Ein Beitrag zum Problem der Mutabilität plasmatischer Systeme. S. 397

- MALY, R., Die Genetik einiger strahlen-induzierter, abweichender Plastidenformen bei Farnen. S. 469
- Die Mutabilität der Plastiden von *Antirrhinum majus* L. Sippe 50. S. 692
- MIKULA, B. s. BRINK, R. A. S. 94
- MILES, P. G. s. RAPER, J. R. und J. P. SAN ANTONIO. S. 540
- MÖHLMANN, E., Chromatographische Untersuchungen an verschiedenen Genotypen von *Plodia interpunctella* im Vergleich mit anderen Schmetterlingsarten. S. 651
- MOSIG, G., Gene für Blüten- und Pollenfärbung bei *Petunia*. S. 471
- MÜLLER, E. s. KUNZE-MÜHL, E. und D. SPERLICH. S. 636
- I., Cytogenetische Untersuchungen an Translokationsheterozygoten von *Petunia hybrida*. S. 246
- MUNDRY, K. W., und A. GIERER, Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nucleinsäure *in vitro*. S. 614
- NAKAO, Y., Y. TAZIMA und Y. SAKURAI, Specificity of interactions between the individual gene locus and the structure of chemical mutagens. S. 216
- NEF, W., Die Variabilität der Manifestation der Mutante Pearl (*Pl*) von *Drosophila melanogaster*. S. 272
- NÜRNBERG-KRÜGER, U., Genetische Untersuchungen an diploiden *Fragaria*-Arten. I. Mitteilung. Die Kreuzung zwischen *Fr. vesca* und *Fr. nilgerrensis*, ihre Auswirkung auf die Morphologie der Pflanzen und die Ausbildung des Geschlechts. S. 747
- OEHLKERS, F., und U. EBELL, Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindley. VII. Die genischen und plasmatischen Grundlagen für die Pollensterilität verschiedener *Streptocarpus*-Bastarde. S. 559
- OSTER, I. I., Interactions between ionizing radiation and chemical Mutagens. S. 1
- POHLENDT, G., Variabilität der Chromosomenzahlen und andere Kernpathologien in *Aegilops triuncialis* × *Triticum aestivum*-Bastarden. S. 170
- POHLEY, H.-J., und H. ESSER, Über das Verhalten muntanter Schuppen auf den Hinterflügeln der Mehlmotte *Ephestia kuehniella* nach Puppenbestrahlungen. S. 707
- POND, V. s. CUANY, R. L. and A. H. SPARROW. S. 7
- RAPER, J. R., J. P. SAN ANTONIO and P. G. MILES, The expression of mutations in common-*A* heterokaryons of *Schizophyllum commune*. S. 540
- RENNER, O., Über den Erbgang des Cruciata-Merkmal der Oenotheren. VI. Mitteilung. Verbindungen der Oenothera lamareckiana Mut. *blandina*. S. 14
- Über den Erbgang des Cruciata-Merkmal der Oenotheren. VIII. Mitteilung. Verbindungen der *Oenothera atrovirens*, und Rückblick. S. 377
- ROBERTS, I. M. s. BLACKITH, R. E. S. 328
- SAKURAI, Y. s. NAKAO, Y. and Y. TAZIMA. S. 216
- SAN ANTONIO, J. P. s. RAPER, J. R. and P. G. MILES. S. 540
- SPARROW, A. H. s. CUANY, R. L., and V. POND. S. 7
- SPERLICH, D., Modellversuche zur Selektionswirkung verschiedener chromosomaler Strukturtypen von *Drosophila subobscura* COLL. S. 422
- SPERLICH, D. s. KUNZE-MÜHL, E., und E. MÜLLER. S. 636
- SPRINGER, R., Die Koppelungsverhältnisse bei den beiden Geschlechtern von *Megaselia scalaris* LOEW (= *Aphiochaeta xanthina* SPEIS). (*Phoridae*) S. 373
- STARLINGER, P. s. BRESCH, C. S. 459
- STRAUB, J. s. ESSER, K. S. 729
- STUBBE, W., Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera*. II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. S. 189
- und L. DIERS, Die Chromosomenformel des *albicans*-Komplexes der Sippe *Grado* von *Oenothera suaveolens*. S. 320
- STUMM, C., Die Analyse von Genmutanten mit geänderten Fortpflanzungseigenschaften bei *Allomyces arbuscula* BUTL. S. 521
- SYBENGA, J., Inbreeding effects in rye. S. 338
- TAZIMA, Y. s. NAKAO, Y. and Y. SAKURAI. S. 216
- TRAUTNER, TH. A., Untersuchungen an Heterozygoten des Phagen T1. S. 264
- ZEUTZSCHEL, B., Entwicklung und Lage der Augenpigmente bei verschiedenen *Drosophila*-Mutanten. S. 508
- ZIEGLER-GÜNDER, I., und E. HADORN, Manifestation rezessiver Augenfarb-Gene im Pterinininventar heterozygoter Genotypen von *Drosophila melanogaster*. S. 235
- ZIEGLER-GÜNDER, I. s. HADORN, E. S. 221
- Adresse des X. International Congress of Genetics zum fünfzigjährigen Bestehen der „Zeitschrift für Vererbungslehre“. S. 774

